

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**RESPUESTA MORFOFISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE  
*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. A ESTRÉS SALINO  
Y TRANSFERENCIA DE HALOTOLERANCIA  
HACIA UN ORGANISMO MODELO**

Por

**RAÚL ALEJANDRO GARZA AGUIRRE**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
con Acentuación en  
Manejo y Administración de Recursos Vegetales

Septiembre, 2020

RESPUESTA MORFOFISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE  
*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. A ESTRÉS SALINO  
Y TRANSFERENCIA DE HALOTOLERANCIA  
HACIA UN ORGANISMO MODELO

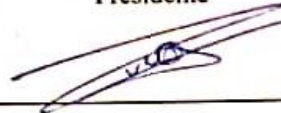
Comité de Tesis



---

Dr. Sergio Moreno Limón

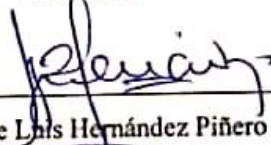
Presidente



---

Dr. Aldo Rodrigo González Luna

Secretario



---

Dr. Jorge Luis Hernández Piñero

Vocal



---

Dr. Sergio Manuel Salcedo Martínez

Vocal



---

Dra. Libertad Leal Lozano

Vocal

RESPUESTA MORFOFISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE  
*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. A ESTRÉS SALINO  
Y TRANSFERENCIA DE HALOTOLERANCIA  
HACIA UN ORGANISMO MODELO

Dirección de Tesis



---

Dr. Sergio Moreno Limón

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis doctoral, Dr. Sergio Moreno Limón, por la dedicación y apoyo incondicional que ha brindado a este trabajo, a mi excelente comité de tesis, por su ejemplo, enseñanzas y respeto a mis sugerencias e ideas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a esta facultad. Asimismo, a todos mis compañeros de posgrado y maestros del Departamento de Botánica por su apoyo personal y humano, especialmente para Álvaro Antonio Sánchez, con quien he tenido también la experiencia de emprender proyectos profesionales durante estos años. Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. Mi más sincero agradecimiento al Dr. Roc Ros Palau y para la Dra. Paula Alepuz, por permitirme realizar mi estancia doctoral en el extranjero en sus laboratorios y con cuyo trabajo y experiencia estaré siempre en deuda, a mis compañeros de laboratorio en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, Sara, Armand y Daniel. Por la revisión cuidadosa de mi trabajo experimental y sus valiosas sugerencias. Y mi gratitud eterna a todos los que bien sabe que sin su apoyo esto no hubiera llegado a buen puerto, no los menciono, pero ustedes saben quiénes son. Al CONACyT por brindarme el sustento económico para realizar mis estudios de posgrado nacional y mi estancia en el extranjero.

Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que más nos estiman. Gracias a mis padres, Bertha Aguirre Velázquez y Raúl Garza Ramos, a mi hermana, Dora Garza, porque con ellos compartí una infancia feliz, que guardo en el recuerdo y me apoyaron para seguir siempre preparándome y estudiando. Gracias a mis heavyamigos, que siempre me han prestado un gran apoyo, necesarios en los momentos difíciles. Pero, sobre todo, gracias a mi hermosa esposa Lilia y a nuestra princesita Abril Alejandra, por ser mi inspiración, por su paciencia, comprensión, amor y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que me han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo. MUCHAS GRACIAS.

## **DEDICATORIA**

Tu risa y cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas de buscar lo mejor para ti. Aun a tu corta edad, me enseñas todos los días a disfrutar y valorar las cosas más importantes de la vida.

Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce de la vida. Fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de tesis.

Gracias, Abril.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. JUSTIFICACIÓN .....	3
3. HIPÓTESIS .....	4
3. OBJETIVOS .....	5
3.1 General .....	5
3.2 Particulares .....	5
5. CAPÍTULOS .....	6
5.1 CAPITULO 1 “Microanálisis foliar de <i>Atriplex canescens</i> (Pursh) Nutt. bajo condiciones de salinidad” .....	6
5.1.1 Resumen .....	6
5.1.2 Introducción .....	7
5.1.3 Material y métodos .....	8
5.1.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	8
5.1.3.2 Microanálisis foliar de <i>A. canescens</i> empleando microscopía electrónica analítica (MEB/EDS). .....	8
5.1.3.2.1 Análisis morfológico .....	8
5.1.3.2.2 Microanálisis .....	9
5.1.3.2.3 Análisis estadísticos. Los datos obtenidos fueron analizados empleando un Análisis de Varianza de una vía, seguido de una Comparación Múltiple de Medias con la prueba de Tukey ( $P<0.05$ ) .....	9
5.1.4 Resultados y discusiones .....	9
5.1.4.1 Germinación de <i>A. canescens</i> y crecimiento bajo condiciones de salinidad .....	9
5.1.4.2 Respuesta morfológica de la superficie foliar de <i>A. canescens</i> a la salinidad .....	9
5.1.4.3 Mecanismo de exclusión y composición química de los tricomas glandulares de <i>A. canescens</i> .....	11
5.2 CAPÍTULO 2 “Descubrimiento de microRNAs de respuesta a estrés salino presentes en <i>Atriplex canescens</i> (Pursh) Nutt.” .....	16
5.2.1 Resumen .....	16
5.2.2 Introducción .....	17
5.2.3 Material y métodos .....	19
5.2.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	19
5.2.3.2 Extracción y purificación de miRNAs .....	19

5.2.3.3 Construcción de las librerías de RNA pequeños y secuenciación profunda. ....	20
5.2.3.4 Identificación de miRNAs conservados y nuevos .....	20
5.2.4 Resultados y discusiones.....	21
5.2.4.1 Abundancia y distribución de miRNAs presentes en <i>A. canescens</i> .....	21
5.2.4.2.1 miRNAs conservados en <i>A. canescens</i> .....	22
5.2.4.2.2 miRNAs nuevos identificados en <i>A. canescens</i> .....	23
5.2.4.3 Expresión relativa y miRNAs de respuesta a estrés salino presentes en <i>A. canescens</i> .....	24
5.3 CAPÍTULO 3 “Función de la familia de genes PGDH durante el estrés salino en un modelo vegetal ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.)”.....	29
5.3.1 Resumen.....	29
5.3.2 Introducción .....	30
5.3.3 Material y métodos.....	33
5.3.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	33
5.3.3.2 q-RTPCR.....	34
5.3.3.3 Determinación de metabolitos y ensayos enzimáticos.....	35
5.3.3.5 Análisis estadístico.....	35
5.3.4 Resultados y discusiones.....	35
5.3.4.1 La expresión génica de la familia PGDH responde de manera diferencial al estrés salino .....	35
5.3.4.2 La actividad PGDH no afecta la tasa de germinación durante el estrés salino .....	36
5.3.4.3 Las isoformas de PGDH afectan de manera diferencial el crecimiento vegetal durante el estrés salino.....	38
5.3.4.4 La sobreexpresión de isoformas PGDH alteran la expresión de metabolitos de respuesta a estrés.....	44
6. CONCLUSIONES .....	52
7. PERSPECTIVAS .....	54
8. BIBLIOGRAFÍA .....	55
9. RESUMEN BIOGRÁFICO .....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. miRNAs conservados en *Atriplex canescens* y sus respectivos genes blanco.....23
2. Tabla 2. Nuevos miRNAs en *Atriplex canescens* identificados como precursores de miRNAs y con una estructura de bucle en horquilla.....24



## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Micrografías (MEB) de la superficie foliar de plántulas de <i>A. canescens</i> de 30 días de edad con y sin exposición a salinidad (200mM de MgCl <sub>2</sub> , NaCl, CaCl <sub>2</sub> , KCl), durante 12, 24 y 48 horas.....	10
2. Figura 2. Micrografía (MEB) del área foliar de <i>A. canescens</i> .....	10
3. Figura 3. Microanálisis de la superficie del tricoma glandular de <i>A. canescens</i> a las 48 horas de exposición a la salinidad.....	12
4. Figura 4. Contenido porcentual de carbono y oxígeno presente en la superficie de las glándulas de <i>A. canescens</i> bajo diferentes tiempos de exposición a salinidad.....	12
5. Figura 5. Contenido atómico porcentual presente en las glándulas de <i>A. canescens</i> a diferentes tiempos de exposición a salinidad.....	13
6. Figura 6. Nivel de expresión relativa de miRNAs conservados en <i>A. canescens</i> bajo condiciones de salinidad (250 mM de NaCl por 24 h).....	26
7. Figura 7. Representación esquemática de las rutas principales de biosíntesis de serina en plantas.....	31
8. Figura 8. La familia de genes PGDH se expresan diferencialmente bajo estrés salino.....	36
9. Figura 9. Tasa de germinación de plantas silvestres (WT), mutantes PGDH y líneas sobreexpresoras PGDH bajo condiciones de salinidad.....	37
10. Figura 10. Peso fresco (PF) de la parte aérea (PA) y raíces de los mutantes y las líneas sobreexpresoras PGDH bajo condiciones de estrés salino.....	40
11. Figura 11. Tasa de crecimiento primario de la raíz de mutantes PGDH y líneas sobreexpresoras bajo estrés salino.....	42
12. Figura 12. La sobreexpresión de las isoformas PGDH afecta diferencialmente el metabolismo bajo estrés salino.....	46
13. Figura 13. El metabolismo del glutatión es alterado diferencialmente por la sobreexpresión de las diferentes isoformas PGDH bajo condiciones de estrés salino.....	48

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

**μm:** micrómetro

**μmol:** micromoles

**3-PGA:** 3-fosfoglicerato

**3-PHP:** 3-fosfohidroxipiruvato

**3-PS:** 3-fosfoserina

**5,10-CH<sub>2</sub>-THF:** 5,10-metilen-tetrahidrofolato

**AB:** abaxial

**ACP:** análisis de componentes principales

**AD:** adaxial

**dds:** días después de la siembra

**GC/MS:** cromatografía de gases/espectrometría de masas

**GDC:** glicina descarboxilasa

**GSH:** glutatión reducido

**GSSH:** glutatión oxidado

**Oex:** sobreexpresoras

**LVD:** detector de bajo vacío

**MEB-EDS:** microscopia electrónica de barrido acoplada al análisis de espectroscopía de energía dispersiva

**MS:** medio Murashige & Skoog

**MFE:** energía mínima de plegamiento

**MFEI:** índice de energía mínima de plegamiento

**miRNA:** microRNA

**mM:** milimolar

**mmol:** milimoles

**mRNA:** RNA mensajero

**mS:** milisiemens

**NGS:** secuenciación de nueva generación

**nt:** nucleótidos

**PA:** parte aérea

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** parénquima de empalizada

**PES:** parénquima esponjoso

**PF:** peso fresco

**PGDH:** 3-fosfoglicerato deshidrogenasa

**PL:** parénquima lagunar

**pre-miRNA:** precursor miRNA primario

**PSAT:** 3-fosfoserina aminotransferasa

**PSP:** 3-fosfoserina fosfatasa

**qRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**rRNA:** RNA ribosomal

**SHMT:** ser-hidroximetil transferasa

**snoRNA:** RNA nucleolar pequeño

**snRNA:** RNA nuclear pequeño

**tRNA:** RNA de transferencia

**WT:** tipo silvestre

## RESUMEN

El estrés salino es una de las formas de estrés abiótico que limita en gran medida la producción y aprovechamiento de los cultivos, especialmente en regiones áridas y semiáridas. En la familia Chenopodiaceae en particular las especies del género *Atriplex* poseen adaptaciones que brindan ventajas en ambientes salinos. En México este género es considerado un importante recurso ecológico, sin embargo es escasa la información que se tiene sobre su fisiología. Con el objetivo de contribuir al conocimiento sobre sus adaptaciones morfofisiológicas, plántulas de *A. canescens* fueron sometidas a estrés salino y analizadas mediante microscopía MEB-EDS; para el abordaje molecular, se generaron librerías de miRNAs de respuesta a estrés utilizando secuenciación masiva NextGen. Una vez caracterizadas estas bibliotecas, se exploró la función biológica de los genes diana implicados en la respuesta a estrés salino a través de ingeniería genética y cromatografía GC/MS en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los resultados derivados de la microscopía MEB-EDS permitieron entender la dinámica y adaptación foliar de *A. canescens* al estrés salino. A través de la secuenciación masiva de librerías fue posible descubrir y predecir, 563 miRNAs, nunca antes reportados para el reino vegetal; un miRNA específico de *A. canescens* (aca-miRn1), sufrió una represión significativa, el cual por complementariedad parece regular la transcripción del factor HIG1/MYB51 el cual a su vez controla la expresión de dos isoformas de la familia PGDH, enzimas que juegan un papel importante en la síntesis de metabolitos de respuesta a estrés como la betaína y el glutatión. Al explorar la función de los genes PGDH durante el estrés salino en *A. thaliana*, se ha corroborado que la actividad de *PGDH3* podría ser perjudicial, mientras que la actividad de *PGDH1* podría tener un efecto benéfico sobre la tolerancia a la salinidad de la planta. Estos resultados sugieren que los aumentos en el contenido de Ser no siempre se correlacionan con una mayor tolerancia a la salinidad, y que se debe tener en cuenta el efecto del aminoácido en órganos/ tejidos específicos. Los resultados parecen ser coherentes con la literatura disponible. Por lo tanto, el presente trabajo proporciona la primera evidencia sobre los miRNAs de respuesta a estrés salino en *A. canescens* y la importancia de las isoformas de la familia PGDH en la respuesta molecular involucrada en la tolerancia de las plantas al estrés salino.

## ABSTRACT

Salt stress is one of the major abiotic stresses limiting crop production especially in arid and semi-arid regions. In Chenopodiaceae family, especially on *Atriplex* genus, it possesses adaptations that give them an advantage in salty environments. In Mexico this genus is considered an important ecologic resource. Nevertheless, knowledge on its physiology is extremely limited. With the objective to generate data on its morphophysiological adaptations, *A. canescens* seedlings were exposed to salt stress and analyzed with analytical microscopy SEM-EDS. For molecular approach, salt stress miRNAs libraries were generated using massive sequencing NextGen. Once analyzed, the biological function of gene targets implied on salt stress was explored through genetic engineering and chromatography GC/MS using *Arabidopsis thaliana* model organism. The microscopic SEM-EDS results allowed understanding adaptation of *A. canescens* leaves to salt stress. Through library massive sequencing, it was possible to discover and predict 563 miRNAs never known before on the plant kingdom. One specific *A. canescens* miRNA (aca-miRn1) suffered a meaningful repression, which for complementarity in the sequence, seems to regulate the transcription factor HIG1/MYB51, which at same time controls the genetic expression of two enzyme isoforms from the PGDH family, enzymes that play a very important role in salt stress metabolites synthesis, such as betaine and glutathione. Exploring PGDH genes function during salt stress in *A. thaliana*, it was shown that PGDH3 activity could be harmful; meanwhile, PGDH1 activity could have a positive effect on salt stress tolerance in the plant. These results suggest that increases on the serine content are not always related to a higher salt tolerance since the amino acid effects in organs or specific tissues should be taken into account. This research provides the first evidence of salt stress effect over *A. canescens* miRNAs and the possible role of PGDH family isoforms in plant salt stress tolerance.

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), México produce un promedio de 32 millones de toneladas de fruta y hortalizas por temporada, generando divisas por exportación de hasta 11,295 millones de dólares anuales, lo anterior representa una parte importante en la nutrición mundial y economía mexicana. Sin embargo, estos cultivos se ven afectados por una amplia gama de factores bióticos y abióticos que disminuyen el rendimiento y causan una variedad de cambios desfavorables para su consumo, exportación, conservación y producción, los cuales se ven reflejados en pérdidas millonarias a nivel nacional.

Las plantas se encuentran expuestas a diferentes tipos de estrés, los cuales pueden ser originados por causas naturales o por la actividad del hombre como la contaminación del aire, sequía, temperatura, intensidad luminosa o limitaciones nutricionales. Debido a que las plantas poseen mecanismos limitados para evitar el estrés, han desarrollado vías flexibles para adaptarse a los cambios medioambientales. La salinidad de los suelos precede al origen de la civilización humana y continúa siendo en la actualidad el mayor estrés abiótico que perjudica la productividad y calidad de las cosechas. Aproximadamente el 20% del área cultivada a nivel mundial y cerca de la mitad de las tierras irrigadas son afectadas por este factor. Dicho fenómeno tiende a aumentar en los suelos de regadío, por el inevitable aporte de sales minerales disueltas en las aguas utilizadas con este fin.

Cuando la salinidad de un suelo se ve incrementada por encima de los valores óptimos de crecimiento, las plantas, responden disminuyendo drásticamente la síntesis de la mayor parte de sus proteínas y frenando su desarrollo. Simultáneamente se inicia o incrementa la síntesis de un gran número de moléculas y una red bioquímica compleja de señales que le permiten a determinados grupos de plantas hacer frente a las altas concentraciones de salinidad, permitiéndoles alcanzar la supervivencia y continuar con su ciclo biológico.

El presente trabajo tiene por objeto el estudio integral de los mecanismos de adaptación a la salinidad presentes en la planta halófito *Atriplex canescens*. A pesar de la gran importancia ecológica y económica que posee esta especie, se cuenta con escasa evidencia sobre sus adaptaciones a nivel morfofisiológico, bioquímico y molecular.

La respuesta de las plantas al estrés iónico y osmótico causado por la salinidad, es un proceso complejo y difícil de analizar por lo que debe hacer uso de las técnicas analíticas más modernas y robustas disponibles, así como herramientas masivas de análisis de información. En esta investigación, a través de la microscopia MEB-EDS, secuenciación masiva NextGen, e ingeniería genética y cromatografía CG/MS, se ha logrado generar evidencia sólida sobre los mecanismos de adaptación al estrés salino presentes en nuestro organismo modelo, analizando además las posibles interacciones entre ellos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la salinidad de los suelos continúa siendo en la actualidad el mayor factor abiótico que perjudica la productividad y calidad de las cosechas, aunado a que aproximadamente el 20% del área cultivada a nivel mundial y cerca de la mitad de las tierras irrigadas son afectadas por este factor, es necesario fortalecer las bases del manejo y administración de los recursos vegetales en nuestro país. La importancia de este estudio, radica en generar bases, enfoques y evidencias experimentales sobre las adaptaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares al estrés salino en especies silvestres como *A. canescens*, enriqueciendo de esta forma la ciencia básica y el conocimiento que se tiene sobre la ecofisiología vegetal, lo que permitirá manejar y aprovechar los recursos vegetales de forma integral, promoviendo futuras investigaciones en el área que culminen con adelantos científicos multidisciplinarios.



### **3. HIPÓTESIS**

La presencia de estructuras anatómicas de almacenamiento de iones específicos, así como el silenciamiento sistemático de mRNAs clave mediado por miRNAs de respuesta al estrés salino, son las principales estrategias involucradas en conferirle halotolerancia a *Atriplex canescens*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Explorar la respuesta morfofisiológica y molecular de *Atriplex canescens* a estrés salino y transferir la halotolerancia hacia un organismo modelo.

#### 3.2 Particulares

Determinar las adaptaciones morfológicas a la salinidad y la composición química de la superficie foliar de *Atriplex canescens* en respuesta al estrés salino.

Identificar y analizar la expresión de miRNAs de *Atriplex canescens* en respuesta a salinidad.

Explorar la función de genes silenciados por miRNAs durante estrés iónico y osmótico en un modelo vegetal (*Arabidopsis thaliana*).

## 5. CAPÍTULOS

### 5.1 CAPITULO 1 “Microanálisis foliar de *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. bajo condiciones de salinidad”

#### 5.1.1 Resumen

El déficit hídrico y la salinidad son las fuentes de estrés abiótico más limitantes en el aprovechamiento de los recursos vegetales. Dentro de la familia Chenopodiaceae, las especies del género *Atriplex*, poseen adaptaciones que brindan ventajas en ambientes salinos. En México, este género es considerado un importante recurso ecológico, sin embargo, es escasa la información que se tiene sobre su fisiología. Con el objetivo de contribuir al conocimiento sobre sus adaptaciones, se evaluó el efecto de la salinidad en plántulas de 30 días de *A. canescens* en tratamientos de 12, 24 y 48 horas empleando MEB-EDS para su posterior análisis. Las imágenes obtenidas revelaron que la superficie foliar posee abundantes tricomas con vacuolas de entre 10-70  $\mu\text{m}$ , lugar en donde la formación de cristales se ve promovida y delimitada. El microanálisis sugiere que estas vacuolas almacenan agua e iones de manera ordenada, siendo los más abundantes el  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . El magnesio es el único elemento presente en todos los tiempos de exposición a la salinidad, lo que sugiere su importancia en el funcionamiento de la glándula. El  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{K}^+$  se detectan a las 12 horas de exposición; sin embargo, este último disminuye su concentración a las 48 horas y es remplazado gradualmente por  $\text{Na}^+$ .

### 5.1.2 Introducción

El estrés abiótico, provoca cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que afectan el crecimiento y productividad de las plantas. El déficit hídrico y la salinidad de los suelos son considerados las fuentes de estrés más importantes y limitantes para el aprovechamiento de los recursos vegetales. Sin embargo, las plantas son capaces de percibir el estrés y responder con diversas estrategias para sobrevivir, cuya tolerancia viene dada por conjuntos de genes, proteínas, metabolitos, células y estructuras especializadas que, al expresarse en determinado patrón, dan lugar a fenotipos tolerantes. Sin embargo en la actualidad estos mecanismos no están del todo esclarecidos (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006).

El estrés salino causa en las plantas sequía fisiológica y estrés osmótico debido al aumento en la cantidad intracelular de iones, principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , los cuales pueden provocar daños a nivel celular y deficiencia nutricional (Hasegawa *et al.* 2000). Las plantas halófitas son capaces de completar su ciclo vital bajo condiciones tóxicas de salinidad, pues poseen mecanismos que les confieren tolerancia mediante la acumulación o exclusión selectiva de iones. Para restablecer la homeostasis iónica, es necesaria una fina regulación de la expresión de transportadores de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , así como la presencia de bombas  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tanto en la membrana plasmática como en la vacuolar. Por otra parte, este tipo de plantas pueden presentar adaptaciones ecofisiológicas de alta eficiencia, como la presencia de glándulas y tricomas excretores de sal, así como cambios en el metabolismo del carbono (Shi y Zhu 2002).

La familia Chenopodiaceae es una de las más interesantes desde el punto de vista ecológico, ya que los géneros y especies que la comprenden se caracterizan por su gran diversidad de formas biológicas y estructuras de tolerancia únicas (Voznesenskaya 1999). El género *Atriplex*, perteneciente a esta familia, cuenta con alrededor de 400 especies, siendo *Atriplex canescens* una de las mejor representadas en zonas áridas y salinas del noreste de México (Echavarría-Cháirez *et al.* 2009). A pesar de que esta especie, tiene la excepcional capacidad de tolerar suelos extremadamente salinos con conductividad eléctrica de 27.96 mS/cm (Moreno-Limón *et al.* 2014), son escasos los

estudios sobre los mecanismos implicados. Con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre esta especie, en el presente trabajo se analizó la morfología y composición química foliar de *A. canescens* a diferentes tiempos de exposición a salinidad haciendo uso de la microscopia electrónica de barrido acoplada al análisis de espectrometría por dispersión de energía de rayos-X (MEB-EDS). Entender las adaptaciones morfofisiológicas y su interacción con su medio ambiente, es fundamental para comprender la ecología y distribución de las especies, permitiendo mejorar e implementar estrategias para el adecuado manejo de los recursos vegetales.

### **5.1.3 Material y métodos**

#### **5.1.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.**

Frutos maduros de *A. canescens* fueron disectados para extraer sus semillas; posteriormente se midieron y pesaron 500 semillas con un vernier digital (Surtek) y una balanza analítica (HR-120; AND USA), respectivamente. Posteriormente fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio al 3% por 10 min, seguido de etanol al 70% por 10 segundos y lavadas en agua destilada. Un total de 100 semillas fueron germinadas en peat-moss utilizando charolas de germinación (10x30 cm), las cuales se colocaron en una cámara bioclimática (26°C±1°C y 12/12 de Fotoperíodo) y se regaron cada 72 horas con agua destilada durante 30 días después de la siembra (dds). Con las plantas resultantes, se formaron cuatro grupos de 25 plantas cada uno, donde el primer grupo representó al control (riego únicamente con agua destilada), mientras que el resto de los grupos fueron tratados respectivamente durante 12, 24 y 48 horas con una solución salina 200 mM de cloruros (MgCl<sub>2</sub>, NaCl, CaCl<sub>2</sub> y KCl).

#### **5.1.3.2 Microanálisis foliar de *A. canescens* empleando microscopía electrónica analítica (MEB/EDS).**

5.1.3.2.1 Análisis morfológico. Se colectaron muestra foliares de cada uno de los tratamientos previamente descritos; posteriormente se extrajeron cortes de la parte central de la hoja de 5 x 5 mm<sup>2</sup>, enseguida fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% para preservar su estructura. La observación transversal y adaxial del área foliar, se realizó con un microscopio electrónico de barrido (NOVA NANOSEM 200, FEI) en condiciones de bajo vacío y a 10 KV de energía de aceleración.

5.1.3.2.2 Microanálisis. Se determinó de manera cualitativa y semicuantitativa la composición química elemental y el porcentaje atómico de los elementos presentes en la superficie foliar de *A. canescens*. Para ello, se utilizó un detector de dispersión de energía de rayos X (Octane Silicon Drift Detector; EDAX) acoplado al microscopio electrónico de barrido. Los espectros obtenidos fueron procesados y analizados en el software TEAM™ EDS bajo las condiciones de trabajo: voltaje de 10kV a una distancia de 4.5 mm, magnificación de 500X, tiempo de adquisición de 60 seg, Spot size: 3.5 mm y un detector de bajo vacío (LVD).

5.1.3.2.3 Análisis estadísticos. Los datos obtenidos fueron analizados empleando un Análisis de Varianza de una vía, seguido de una Comparación Múltiple de Medias con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

#### **5.1.4 Resultados y discusiones**

##### **5.1.4.1 Germinación de *A. canescens* y crecimiento bajo condiciones de salinidad**

El tamaño y peso promedio de las semillas de *A. canescens* fue de 2.61x1.82 mm y 2.14 mg respectivamente, con un porcentaje de germinación de 87.5. Las plántulas de 30 dds, no mostraron signos visibles de estrés tras aplicar la solución salina de cloruros a las 12, 24 y 48 horas, en comparación con el grupo control.

##### **5.1.4.2 Respuesta morfológica de la superficie foliar de *A. canescens* a la salinidad**

La superficie foliar del grupo control muestra una gran cantidad de tricomas glandulares claramente pedicelados en estado colapsado, sin la presencia de cristales en su interior o exterior. A las 12 horas de exposición a salinidad, aproximadamente el 50% de las glándulas se encuentran en estado semi-turgente con un tamaño promedio entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ . A las 24 horas de exposición, el 90% de las glándulas se encuentran en estado turgente y sin la presencia de cristales en su interior. A las 48 horas de exposición, se puede observar que las glándulas han colapsado, mostrando una gran cantidad de sedimentos y cristales. Resulta importante mencionar que el tamaño de las células epiteliales asociadas al tricoma glandular incrementó considerablemente de 50 a 100  $\mu\text{m}$ . Adicionalmente, se observó que la exposición a la salinidad por 12 horas resulta suficiente para activar la modificación estomática, pasando de estomas expuestos a

encriptados en la epidermis (Figura 1). El análisis foliar reveló la presencia de anatomía de Kranz en *A. canescens*, esto debido a la presencia de células de la vaina que rodean los haces vasculares y abundante parénquima lagunar (Figura 2).

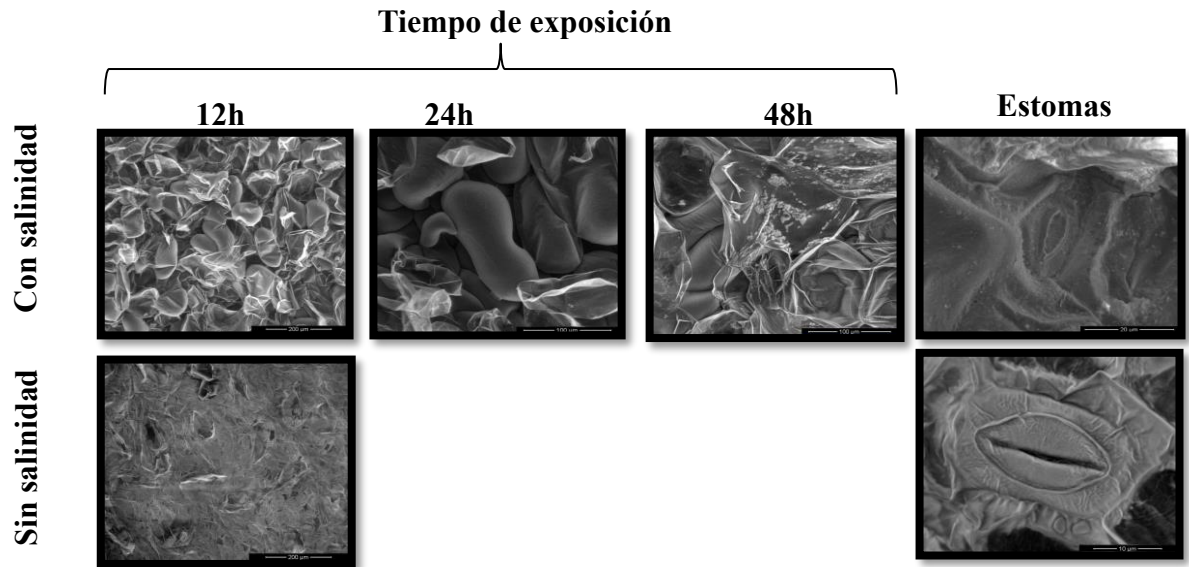


Figura 1. Micrografías (MEB) de la superficie foliar de plántulas de *A. canescens* de 30 días de edad con y sin exposición a salinidad (200mM de  $MgCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ), durante 12, 24 y 48 horas.

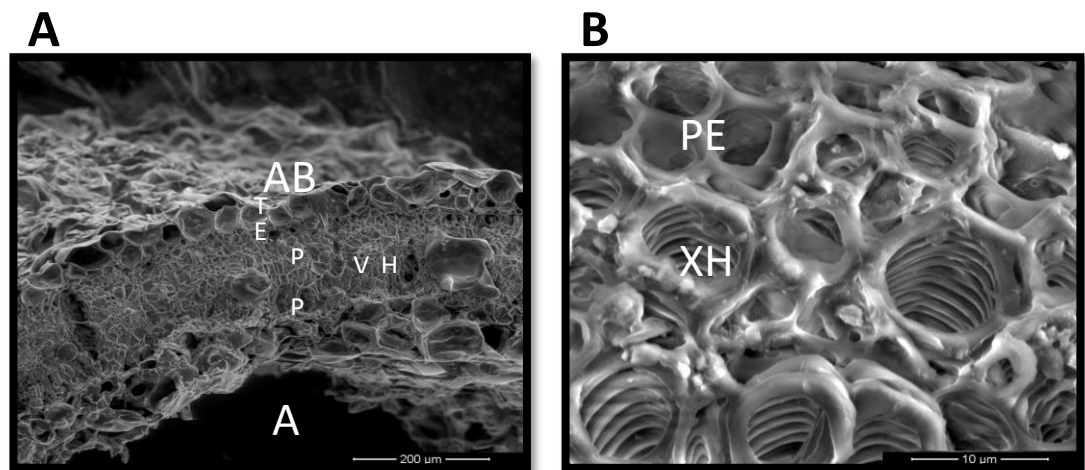


Figura 2. Micrografía (MEB) del área foliar de *A. canescens*. A) Corte transversal, B) Haz vascular. AB: superficie abaxial, AD: Superficie adaxial, E: Epidermis, H: Haz vascular, T: Tricoma glandular, PE: Parénquima de empalizada, PES: Parénquima esponjoso, PL: Parénquima lagunar, V: Células de la vaina, XH: tráquea helicada.

#### **5.1.4.3 Mecanismo de exclusión y composición química de los tricomas glandulares de *A. canescens***

Los tricomas glandulares de *A. canescens* presentan una o más vacuolas, con tamaño y forma irregulares que van de 10 a 70  $\mu\text{m}$ , las cuales pueden o no estar presentes en los tricomas. Mediante el análisis MEB-EDS, se detectó que estos compartimientos subcelulares poseen en su interior el contenido total de los elementos presentes en los tratamientos de salinidad, siendo los más abundantes el  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ; además, se puede observar que la formación de los cristales se ve promovida y confinada por estas zonas (Figura 3). Con la información obtenida mediante el análisis semicuantitativo MEB-EDS en la superficie foliar de *A. canescens* se determinó mediante ANOVA que, con excepción del carbono y potasio, el resto de los elementos presentes en las glándulas de *A. canescens* mostraron diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) entre los tratamientos. El carbono y el oxígeno se presentan en una mayor concentración, observándose que el primero es directamente proporcional y el segundo inversamente proporcional al tratamiento de salinidad, los cuales alcanzan poco más del 50 y 60% del contenido atómico respectivamente (Figura 4). Como se puede observar en la Figura 5, el magnesio es el único elemento presente en los cuatro tiempos de exposición a salinidad, mientras que el cloro y el potasio comienzan a presentarse a las 12 horas; sin embargo, este último disminuye su concentración a las 48 horas. Por otra parte, el calcio y el sodio únicamente se detectaron a las 48 horas de exposición.



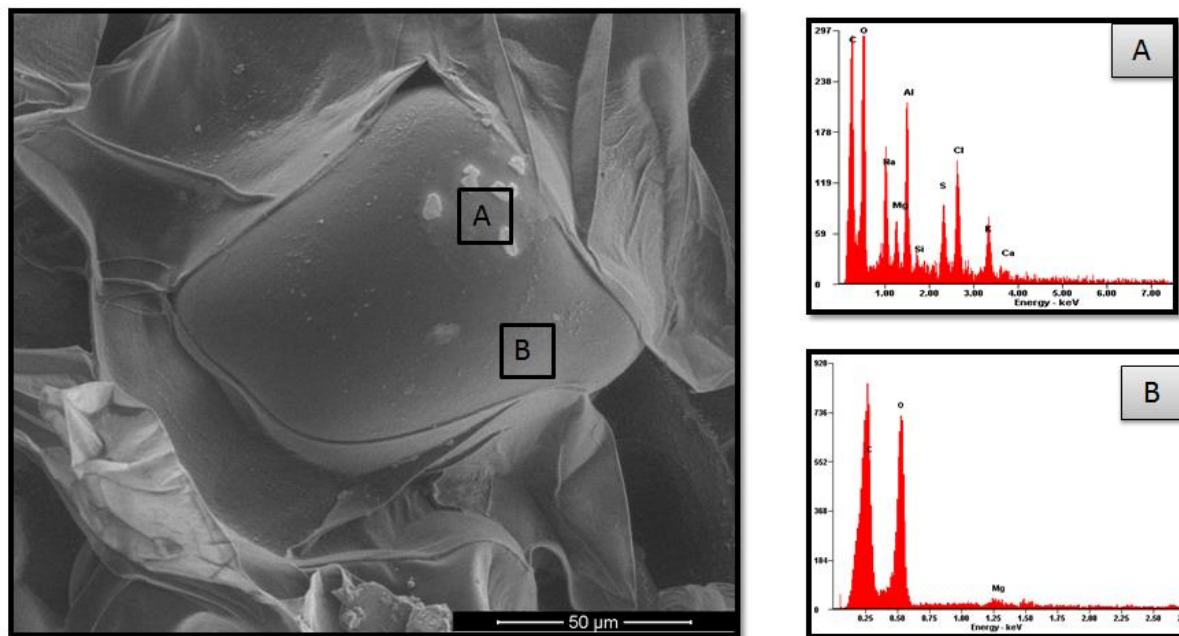


Figura 3. Microanálisis de la superficie del tricoma glandular de *A. canescens* a las 48 horas de exposición a la salinidad. A) Zona de la vacuola y espectro de dispersión de rayos X. B) Zona no vacuolada y espectro de dispersión de rayos X. C: carbono, O: oxígeno, Zn: zinc, Na: sodio, Mg: magnesio, Al: aluminio, Si: silicio, S: azufre, Mo: molibdeno, Cl: cloro, K: potasio, Ca: calcio.

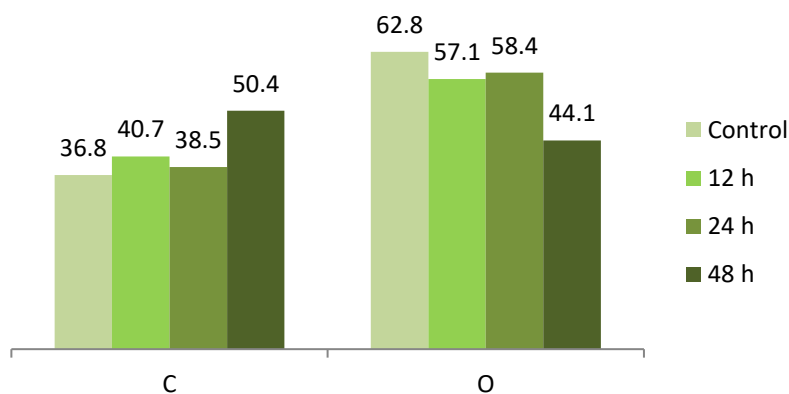


Figura 4. Contenido porcentual de carbono y oxígeno presente en la superficie de las glándulas de *A. canescens* bajo diferentes tiempos de exposición a salinidad. C: carbono, O: oxígeno. Valor mínimo detectable, > a 0.01%.

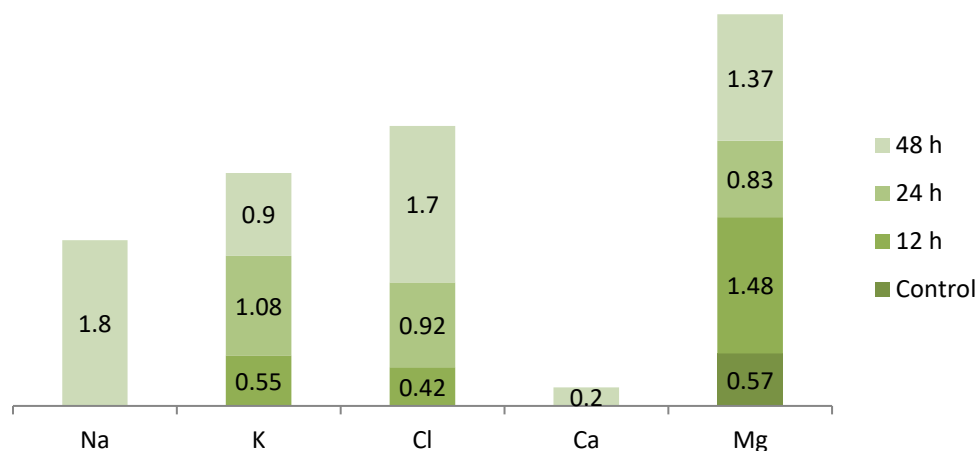


Figura 5. Contenido atómico porcentual presente en las glándulas de *A. canescens* a diferentes tiempos de exposición a salinidad. Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS). Mg: Magnesio, Ca: Calcio, Cl: Cloro, K: Potasio, Na: Sodio. Valor mínimo detectable, > a 0.01%.

En esta investigación *A. canescens* no mostró signos visibles de estrés al ser sometida a un choque de salinidad durante 12, 24 y 48 horas de exposición, lo cual es consistente con diversos reportes que demuestran la capacidad del género para desarrollarse a concentraciones de salinidad incluso superiores. Al respecto Aslam *et al.* (1986) y Faycal y Mounir (2011), evidenciaron que *A. amnícola* y *A. halimus* respectivamente, logran desarrollarse en un rango de 400-800 mM de NaCl. Los resultados obtenidos a través del análisis de la morfología foliar, permitieron evidenciar que las estrategias adaptativas a la salinidad presentes en *A. canescens* pudiesen estar dirigidas hacia dos mecanismos morfofisiológicos principales; por una parte, la exclusión de iones a través de la expresión elevada de tricomas glandulares presentes en la superficie foliar y, en segundo, por la anatomía de Kranz, la cual algunos autores como Sage y Monson (1999), han hecho referencia al metabolismo C4, como un mecanismo importante para combatir la escasez de agua en zonas áridas y la sequía fisiológica producida por la salinidad. Esta estrategia ecológica permite a *A. canescens* y otras especies con metabolismo C4, como *A. coriacea*, *A. rosia*, *A. spongiosa*, *A. undulata* y *A. patula* (Kaderit *et al.* 2003), responder frente al estrés iónico y osmótico (Mitsch y Gosselink 1993). La respuesta a la salinidad debe ser un proceso rápido y organizado, pues deben entenderse en conjunto mecanismos a nivel molecular, bioquímico, fisiológico y morfológico. Los resultados obtenidos sugieren que el movimiento de agua, la

activación glandular y la *compartimentalización* de iones en *A. canescens* requiere al menos 12 horas de exposición al estrés, lo cual contrasta con lo reportado por Munns (2002), quien sugiere que las plantas glicofitas previamente expuestas a salinidad, requieren hasta 27 horas para restablecer los daños originados por el estrés osmótico. Se ha reportado en trabajos previos la presencia y composición química de cristales y sales en la superficie foliar y la parte externa de las glándulas de *A. hastata* (Apóstolo 2005), sin embargo, para *A. canescens*, los resultados sugieren que la compartimentalización de iones y su logística a través del tricoma glandular parecen ser procesos muy organizados. En esta investigación evidenciamos gracias al análisis MEB-EDS, que los tricomas glandulares de *A. canescens* poseen una serie de vacuolas de tamaño y forma irregular, nunca antes reportadas para el género *Atriplex*, las cuales permiten la compartimentalización selectiva de iones en tiempo y espacio determinados, tarea que implica un gasto considerable de energía haciendo evidente la importancia que este mecanismo presenta. Los resultados sugieren que el papel principal de estas estructuras subcelulares sería secuestrar y cristalizar los iones más tóxicos (cloro y sodio), disminuyendo el daño celular y la difusión de éstos hacia otros tejidos más sensibles como lo son las células del mesófilo, además de ayudar en gran medida al reciclaje del agua, elemento esencial en zonas áridas y con problemas de salinidad. Apóstolo (2005), reporta cristales de oxalato de magnesio y calcio para *A. hastata* y *Chenopodium macrospermum*, Sin embargo, para *A. canescens* se han encontrado únicamente cristales atómicamente constituidos por sodio y cloro. Por otra parte, mediante el análisis de imágenes MEB se logró distinguir que el mecanismo de los tricomas glandulares de *A. canescens* difiere de lo reportado para *A. hastata* y *A. halimus* (Mozafar y Goodin 1970; Breckle *et al.* 1990), pues la glándula no estalla o excreta las sales al ambiente. La ausencia de cristales en la parte externa de la superficie foliar, la disminución en el tamaño de la glándula y el contenido de oxígeno presente en su interior (el cual es inversamente proporcional al tiempo de exposición) soportan la hipótesis de que el agua podría ser reciclada aproximadamente a las 48 horas de exposición a la salinidad. El magnesio, en concordancia con la literatura, es un elemento indispensable para la dinámica y funcionalidad de los tricomas de *A. canescens*, el cual, de acuerdo al microanálisis foliar, estuvo presente durante todos los tratamientos con un porcentaje

atómico entre 0.6-1.5 %; en este sentido, se ha puesto de manifiesto que el  $Mg^{+}$  regula el transporte de  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Cl^{-}$  e influye en el movimiento de iones a través de los canales de los mismos (Flatman 1991). Otra función relevante del  $Mg^{+}$  es la de estabilizar las membranas mediante la formación de complejos con los fosfolípidos. Por el contrario, el déficit de  $Mg^{+}$  incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática, aumentando los niveles intracelulares de  $Ca^{+}$  y disminuyendo los de  $K^{+}$  (Planells *et al.* 1993); esto podría explicar porque el calcio únicamente se detecta a las 48 horas y en concentraciones muy cercanas al límite mínimo de detección. Por otro lado, el  $K^{+}$  y el  $Cl^{-}$  se detectan en las vacuolas del tricoma una vez que las plantas son expuestas a salinidad y constituyen el 1.1 y 1.7 % del porcentaje atómico total tendiendo a incrementarse hacia las 24 y 48 horas, respectivamente; este proceso es estrictamente necesario para abrir paso a la compartimentalización del  $Na^{+}$  a las 48 horas de exposición, alcanzando un porcentaje de 1.8 %, semejante al encontrado para el  $Cl^{-}$ , fomentando así la formación de cristales en la vacuola. Estos resultados proporcionan algunas evidencias sobre las adaptaciones morfofisiológicas de *A. canescens* a los climas extremos. Sin embargo, debido a la complejidad y al carácter multigénico de la respuesta al estrés abiótico, resulta importante considerar que es necesario realizar más investigaciones que ayuden a esclarecer los mecanismos implicados.

## 5.2 CAPÍTULO 2 “Descubrimiento de microRNAs de respuesta a estrés salino presentes en *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.”

### 5.2.1 Resumen

*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. es una planta halófila silvestre que se encuentra a menudo en suelos áridos y ambientes desérticos de México. Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes que juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo y en la respuesta de las plantas al estrés ambiental. Existen muy pocos reportes sobre miRNAs de respuesta a estrés pertenecientes a plantas halófitas. En este estudio, se han generado dos librerías de miRNAs pertenecientes a *A. canescens*, una bajo condiciones control y otra bajo estrés salino aplicando 250 mM de NaCl durante 24 horas; lo anterior resultó en el descubrimiento de 107 miRNAs conservados, previamente descritos para otras especies de plantas. Adicionalmente, se ha empleado una base de datos pública transcriptómica de *Beta vulgaris*, la cual permitió descubrir y predecir, mediante un análisis *in silico*, 563 miRNAs, nunca antes reportados para el reino vegetal, a través de sus secuencias precursoras (pre-miRNA). En total, solo dos miRNAs muy abundantes disminuyeron significativamente su expresión durante el estrés salino y cuatro miRNAs se sobreexpresaron durante las mismas condiciones de estrés. Además, comparando la complementariedad de las secuencias, se determinó que 14 miRNAs conservados regulan más de 141 genes, mientras que un miRNA específico de *A. canescens*, nunca antes reportado, sufrió una represión significativa, el cual parece regular la transcripción del factor HIG1/MYB51, el cual controla la expresión de dos isoformas de la familia PGDH, las cuales juegan un papel importante en la síntesis de metabolitos de respuesta a estrés tal como la betaína y el glutatión. Con ayuda de un análisis ontogénico, se encontró que diversos RNA mensajeros (mRNA) diana, participan en varios procesos biológicos importantes, los cuales podrían estar implicados en la tolerancia a la salinidad. La expresión relativa de estos miRNAs fue detectada a través de secuenciación Illumina y los resultados parecen ser coherentes con la literatura. Por lo tanto, el presente trabajo representa la primera evidencia sobre los miRNAs de respuesta a estrés y sugiere la posible red molecular involucrada en la adaptación a la salinidad de *A. canescens*.

### 5.2.2 Introducción

Debido a que las plantas son organismos sésiles, estas se ven sometidas frecuentemente a perturbaciones ambientales adversas conocidas como estrés abiótico. Dichas perturbaciones representan uno de los factores más importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas, y se han convertido en uno de los mayores retos para la producción, calidad y rendimiento de los cultivos. Así mismo, el nivel de salinidad en el suelo es considerado uno de los tipos de estrés abiótico más importantes dentro de la naturaleza.

Las plantas han desarrollado mecanismos especializados para detectar y responder a los cambios ambientales (Wani *et al.* 2016). Para ‘activar’ estos mecanismos protectores, las plantas desencadenan diversos procesos genéticos como la regulación de la transcripción y/o traducción, así como la modificación de la expresión de una gran cantidad de genes, mediada a través de varias estrategias. La resistencia de las plantas al estrés salino es controlada por múltiples genes y es regulada en varios niveles, por ejemplo, a nivel molecular, varios genes están involucrados en dicha respuesta (Zhu 2010; De Costa *et al.* 2007).

Los MicroRNAs (miRNAs) son una serie de RNA endógenos no codificantes que, basados en la secuencia complementaria de su(s) blanco(s), pueden regular negativamente la expresión genética, ya sea a nivel transcripcional, post-transcripcional o traduccional, al modular la degradación de mRNA y la supresión de la actividad ribosomal (Sunkar y Jagadeeswaran 2012). En plantas, uno de los mecanismos para la biogénesis de miRNAs comienza con la transcripción de un largo transcripto primario conocido como ‘precursor miRNA primario’ (pri-miRNA), el cual es transcrito a partir de un gen miRNA codificado en el núcleo. A continuación, un dúplex de miRNA:miRNA\* es liberado del bucle en horquilla del pri-MRNA gracias a dos cortes realizados por la proteína Dicer-like 1 (DCL1) asistida por la proteína de anclaje de dsRNA HYL1 (Kurihara *et al.* 2006). Finalmente, el miRNA maduro es metilado por la proteína HEN1 (Yu *et al.* 2005) que después se liga a la proteína argonauta 1 (AGO1), formando así una estructura funcional especial conocida como el complejo RISC (RNA-

induced silencing complex), el cual ubica mRNAs específicos y suprime su expresión induciendo su anclaje.

Además del papel desempeñado en la modulación de un gran número de procesos bioquímicos, moleculares y fisiológicos, muchos estudios reportan que los miRNAs están involucrados en la respuesta de las plantas a diversos tipos de estrés abiótico como son la salinidad (Liu *et al.* 2008 y Ren *et al.* 2013), sequía (Li *et al.* 2011 y Eldem *et al.* 2012), altas temperaturas (Yu *et al.* 2011 y Chen *et al.* 2012), bajas temperaturas (Zhang *et al.* 2014) y estrés oxidativo (Sunkar 2006). Un gran número de estudios sugieren que la regulación genética mediada por los miRNA podría desempeñar un papel vital en la respuesta de las plantas frente al estrés salino. Entender el funcionamiento de las vías de regulación genética mediadas por miRNAs durante la respuesta de las plantas al estrés salino, permitirá sentar las bases para dilucidar los complejos mecanismos genéticos y moleculares que intervienen en la adaptación y tolerancia de las plantas a ambientes salinos, lo que a su vez podría permitir el reproducir dichas adaptaciones en otros organismos. Recientemente, la aplicación extensiva de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido la obtención de datos de secuenciación comprensibles que pueden ser utilizados para la detección de miRNAs involucrados en respuesta a condiciones de estrés salino en varias especies de plantas.

La planta halófila *Atriplex canescens*, un miembro de la familia Chenopodiaceae, ha sido utilizada en estudios moleculares y fisiológicos para la identificación y descubrimiento de nuevos genes involucrados en la respuesta frente al estrés salino. La tolerancia a la salinidad y sequía presentes en las especies de *Atriplex* son una de las principales características por las que estas plantas son utilizadas como modelos de estudio en estos trabajos. A pesar de lo anterior, hasta la fecha no existe algún reporte científico que se haya enfocado en la identificación de los miRNAs y los genes blanco involucrados en la respuesta al estrés salino en esta especie.

En el presente trabajo, se obtuvieron dos librerías de RNA pequeños a partir de las plantas de *A. canescens* sometidas a estrés salino y otra de aquellas utilizadas en el

control. Dichas librerías fueron construidas y secuenciadas utilizando NGS, con las cuales ha sido posible identificar los miRNAs involucrados en respuesta a altos niveles de salinidad, así como explorar el papel que estos juegan en la respuesta de la planta ante el estrés salino, permitiendo identificar y predecir los blancos de sus transcriptos. El resultado de este estudio podría proporcionar información relevante para la futura validación del rol de los miRNAs como reguladores de la respuesta ante el estrés salino, así como facilitar la descripción de los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación a la salinidad en plantas.

### **5.2.3 Material y métodos**

#### **5.2.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Las plantas de *A. canescens* (Pursh) Nutt. utilizadas para las preparaciones de RNA fueron cultivadas en un sustrato mixto de vermiculita y ‘peat moss’ (1:1), implementando un plan de riego con solución Hoagland dos veces por semana hasta la aplicación del tratamiento. Se estableció el crecimiento de las plantas bajo las siguientes condiciones controladas: 21 a 23 °C, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , una humedad relativa de 60% y un fotoperiodo constante de 14 h (14h luz/ 10h oscuridad) (Jasoni *et al.* 2002). Después de 50 días de crecimiento las plantas sometidas al tratamiento por estrés salino fueron regadas con una solución de 250 mmol/L de NaCl; las plantas a las que no se les aplicó dicho tratamiento fueron utilizadas como el control. Transcurridas 24 h de la aplicación del tratamiento, las muestras recolectadas de las plantas (hojas jóvenes, tallos y raíces) fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y mantenidas a una temperatura de – 80°C hasta que se realizó el protocolo de extracción de RNA total.

#### **5.2.3.2 Extracción y purificación de miRNAs**

El RNA total fue extraído de las muestras de *A. canescens* utilizando un kit de aislamiento mirVana™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La calidad de la extracción de RNA fue medida utilizando espectrofotometría, mientras que su integridad fue verificada utilizando un gel de agarosa.



#### **5.2.3.3 Construcción de las librerías de RNA pequeños y secuenciación profunda.**

La librería de RNAs pequeños fue generada a partir de las muestras totales de RNA utilizando el kit de Illumina Truseq™ Small RNA Preparation (Illumina Inc., Santa Clara, CA, USA) según la guía ‘Illumina’s TruSeq™ Small RNA Sample Preparation Guide 1’. El proceso general es el siguiente: primero, el RNA total se liga a adaptadores de RNA 3’ y RNA 5’. Segundo, se efectúa la transcripción reversa por PCR creando constructos de cDNA basados en los RNA pequeños ligados a los adaptadores 3’ y 5’. Tercero, las fracciones pequeñas de cDNA que van desde los 22 nucleótidos hasta los 30 nt fueron aisladas utilizando un gel desnaturalizante de poliacrilamida para electroforesis. Cuarto, los constructos de cDNA fueron purificados y la librería fue validada. La librería de cDNA purificada fue utilizada para la generación en cluster, utilizando Cluster Station de Illumina y posteriormente fue secuenciada utilizando GAIIx de Illumina (Illumina Inc., Santa Clara, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias en crudo (40 nt) fueron obtenidas utilizando el software Sequencing Control Studio versión 2.8 (SCS v2.8) de Illumina; al mismo tiempo, se realizó un análisis de secuenciación de imagen en tiempo real utilizando el software Real-Time Analysis version 1.8.70 (RTA v1.8.70) de Illumina. El programa ACGT101-miR (version 4.2; LC Sciences) fue empleado para los análisis de secuenciación estándar (Li *et al.* 2010; Wei *et al.* 2011; Meyer *et al.* 2010).

#### **5.2.3.4 Identificación de miRNAs conservados y nuevos**

Después de obtener las lecturas de las secuencias en crudo, los adaptadores e impurezas, las secuencias restantes que se encontraran entre un rango de 15 a 30 nt fueron utilizadas para la predicción de miRNAs utilizando el programa ACGT101-miR (version 4.2; LC Sciences). En primer lugar, las secuencias encontradas fueron buscadas en la base de datos RFam (rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA y otros RNA no codificantes), las secuencias repetidas y que coincidieran fueron descartadas. Debido a que no existen datos del genoma de *A. canescens*, las secuencias fueron comparadas contra el genoma de *Beta vulgaris*, descargado de la base de datos correspondiente a esta especie (<http://bvseq.molgen.mpg.de/Genome/Download/RefBeet-1.1/>). Aquellas secuencias que no coincidieran fueron removidas. Finalmente, las secuencias restantes fueron relacionadas con los miRNAs conocidos en plantas para identificar los miRNAs

potencialmente conservados en *A. canescens*; esto fue realizado utilizando la información contenida en la base de datos MiRBase (version 21.0, <http://www.mirbase.org/>). Las secuencias similares con no más de tres diferencias fueron consideradas como candidatos a miRNAs conservados. Al mismo tiempo, aquellas secuencias que no arrojaran coincidencias fueron reservadas como candidatos a nuevos miRNAs. Para identificar los miRNAs conservados o nuevos en *A. canescens*, ambas secuencias fueron nuevamente comparadas con el genoma de *B. vulgaris*, y se emplearon las secuencias complementarias para predecir sus estructuras secundarias mediante el servidor Web mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/download-mfold>) (Zuker 2003). Los precursores potenciales de miRNAs deben tratarse de secuencias no codificantes y deben cumplir los siguientes criterios: el primero y más importante, el criterio miRNA/miRNA\*, que dicta que ambos, el candidato a miRNA y su secuencia reversa correspondiente, es decir la secuencia de miRNA\* candidata, deben ser detectados utilizando secuenciación de alta eficiencia. El segundo criterio, las secuencias del candidato a miRNA y miRNA\* deben ser encontradas en el tallo del bucle y el número de bases que no coincidan entre ellos deben ser menores a cuatro. El tercer criterio señala que entre el duplex de miRNA/miRNA\* el número de bucles debe ser igual o menor a uno, y el número de bases despareadas en el bucle debe ser menor a dos. El cuarto criterio menciona que el miRNA y el miRNA\* deben localizarse en brazos opuestos del tallo del bucle y formar un duplex con dos salientes de nucleótidos 3' (Meyers *et al.* 2008). El quinto criterio indica que el precursor potencial de miRNA debe tener una energía mínima de plegamiento (MFE) negativa y un índice de energía mínimo para el plegamiento (minimal folding energy indexes (MFEI)) siendo el MFEI > 0.8, para distinguirlo de otros RNA pequeños (Zhang *et al.* 2006). Siguiendo estos cinco criterios se determinó si los miRNA encontrados durante el estudio fueron conservados o nuevos.

## **5.2.4 Resultados y discusiones**

### **5.2.4.1 Abundancia y distribución de miRNAs presentes en *A. canescens*.**

La secuenciación profunda de las dos librerías generó un total de lecturas crudas de 15,472,639 (control) y 11,323,212 (plantas tratadas con sal). Después de remover las

secuencias de baja calidad y aquellas pertenecientes a impurezas de la secuenciación, el total de lecturas restantes consideradas para mapeo fue de 12,773,736 y de 9,870,100, respectivamente. El tamaño de distribución de las lecturas restantes fue evaluado y los datos mostraron que la clase de mayor tamaño de RNA pequeños fueron los de 24 nt, seguidos por aquellos de 21, 22, 23 y 19 nt. Resultados similares fueron reportados en otras especies de plantas, tales como *Arabidopsis thaliana* (Rajagopalan *et al.* 2006 y Fahlgren *et al.* 2007), *Medicago truncatula* (Szittyá 2008), *Oryza sativa* (Morin *et al.* 2008), *Arachis hypogaea* (Chi *et al.* 2011) y *Cucumis sativus* (Martínez *et al.* 2011).

A partir de los análisis realizados utilizando el genoma de *Beta vulgaris*, se observó que el 20.3% de las lecturas podían vincularse a pre-miRNA ya conocidos contenidos en la base de datos miRbase. Así mismo, el 9% de las lecturas fueron vinculadas a mRNA encontrados en otras especies de plantas, así como otros RNA como tRNA, rRNA, snRNA y snoRNA. Adicionalmente, algunas de las lecturas que no pudieron ser vinculadas a pre-miRNAs y otros RNA en la base de datos, fueron vinculadas a secuencias del genoma de *B. vulgaris* y una fracción de estas mostraron altas probabilidades de formar estructuras de bucle en horquilla. Cabe destacar que más de la mitad de las lecturas no pudieron ser vinculadas a ninguna información o base de datos.

#### **5.2.4.2 Identificación de miRNAs conservados y *de novo* en *A. canescens*.**

##### **5.2.4.2.1 miRNAs conservados en *A. canescens***

A través de la comparación de la información disponible en la base de datos miRBase 21.0 y la homología de las secuencias obtenidas, se encontraron 107 miRNAs. La mayoría de los miRNA identificados tenían una longitud de 20 – 22 nt., y se los clasificó en 14 familias diferentes (Tabla 1). El número de miembros en cada familia muestra una divergencia significativa. La familia miR166 es la más grande con 7 miembros, las familias miR319, miR159 y miR167 tiene 3, 3 y 5 miembros cada una, respectivamente. Cinco de las familias, es decir, miR396, miR156, miR394, miR168 y miR172, contaron con 4 miembros cada una, y las cinco familias restantes contenían uno a dos miembros identificados.

Con la evidencia científica encontrada en la base de datos miRBase 21.0 se pudo determinar que estas 14 familias de miRNA conservados regulan al menos 141 genes, incluyendo algunos que regulan factores de transcripción clave y proteínas de interacción con el DNA. Resulta interesante que existan reportes anteriores para cada uno de estos genes, los cuales parecen regular simultáneamente a otros genes involucrados en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico, siendo su papel probablemente el de activar o inhibir vías de señalización. Estos genes regulados secundariamente no son mostrados en este trabajo.

Tabla 1. miRNAs conservados en *Atriplex canescens* y sus respectivos genes blanco.

Nombre miR	Secuencia miR	Referencia miR	Descripción del blanco
<b>aca-miR166a-3p</b>	TTCGGACCAGGCTTCATCCCC	ath-miR166a-3p	Homeobox-leucine zipper protein ATHB8, ATHB9, ATHB14, ATHB15, FL
<b>aca-miR319a</b>	CTTGGACTGAAGGGAGCTCCCC T	ath-miR319a	MYB DOMAIN PROTEIN MYB104, MYB33, ATMYB65
<b>aca-MIR159a-p5</b>	AGCTCCTTTTGATCCAAAAAC	mdm-MIR159a-p5	Proteínas MYB
<b>aca-miR167d-3p</b>	GATCATGTGGTAGCTTCACC	stu-miR167d-3p	Desconocido
<b>aca-miR396a-5p</b>	TTCCACAGCTTTCTTGAAGCTG	ath-miR396a-5p	Growth Regulating Factor (GRF), rhodanase-like proteins y kinesin-like protein B
<b>aca-miR156a-3p</b>	GCTCACTGCTCTTTCTGTCATC	ath-miR156a-3p	Squamosa-promoter Binding Protein (SBP) box
<b>aca-miR394a</b>	TTGGCATTCTGTCCACCTCC	ath-miR394a	Proteínas F-box
<b>aca-miR167a-5p</b>	TGAAGCTGCCAGCATGATCTC	ath-miR167a-5p	Auxin response factors
<b>aca-miR157d</b>	CTGACAGAAGATAGAGAGCAC	ath-miR157d	Squamosa-promoter Binding Protein (SBP)
<b>aca-miR894</b>	CACGTCGGGTTCACCA	ppt-miR894	Desconocido
<b>aca-miR168a</b>	TCGCTTGCTGCAGGTCGGGAA	lus-miR168a	Desconocido
<b>aca-miR172a</b>	CGAATCTTGATGATGCTGCAT	ath-miR172a	APETALA2-like transcription factors
<b>aca-miR535</b>	TGACGATGAGAGAGAGCACGC	cpa-miR535	Desconocido
<b>aca-miR168a-3p</b>	CCCGCCTTGATCAACTGAAT	ath-miR168a-3p	AGO1, SUVR4

#### 5.2.4.2.2 miRNAs nuevos identificados en *A. canescens*.

Un total de 563 secuencias fueron tomadas como candidatas para ser potenciales miRNA no conservados y responsivos al estrés salino. Utilizando los criterios de anotación antes descritos para miRNAs en plantas, se reconocieron 10 secuencias de alta confianza como nuevos miRNA (Tabla 2). El largo de los miRNA maduros varió de entre 17 a 24 nt, siendo la mayoría de 24 nt. De igual forma, el largo de las cadenas de

los precursores de miRNA osciló entre los 67 a los 281 nt, con una longitud promedio de 163 nt. La MFE promedio de estos nuevos precursores de miRNA fue de  $-78.39 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Estos nuevos miRNA mostraron una abundancia menor comparado con los miRNA conservados, lo que es consistente con estudios previos (Fahlgren *et al.* 2007; Mao *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012). Los nuevos miRNA mostraron también diferencias en el nivel de expresión, y lo más importante, se mostró que aca-miRn1 (Log2 -1.85) fue el nuevo miRNA más abundante, con un total de 3,166.20 lecturas normalizadas (Tabla 2). De igual forma, se observó que, en cada una de las 563 secuencias nuevas, el primer o según nucleótido de cada uno de los nuevos genes miRNA tendía a ser (U). Tal y como se esperaba, los miRNA son atraídos hacia el complejo RISC con ayuda de AGO1. Otros investigadores han encontrado que las proteínas AGO1 tienen más afinidad con los uracilos encontrados en el extremo 5' de los miRNA, por lo que existe una tendencia a encontrar secuencias de miRNA con nucleótidos de uracilos en las primeras posiciones (Mi *et al.* 2008).

Tabla 2. Nuevos miRNAs en *Atriplex canescens* identificados como precursores de miRNAs y con una estructura de bucle en horquilla.

Nombre miR	miR seq	Conteo	
		Control	Estrés salino
<b>aca-miRn1*</b>	<b>GCTGCAGTAGCACTTTGG*</b>	<b>3,166.20*</b>	<b>875.64*</b>
<b>aca-miRn2</b>	<b>GGGTTACCATGTAGAATTTTCCA</b>	10.91	0
<b>aca-miRn3</b>	<b>TTTCAGATCGGATATTTTCGGATC</b>	10.91	0
<b>aca-miRn4</b>	<b>GAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGC</b>	39.54	4.4
<b>aca-miRn5</b>	<b>AGGTTGCGAAAAGAATGGCGTTTCT</b>	10.91	2.2
<b>aca-miRn6</b>	<b>GTAGTCATCATTCTCCCACTT</b>	16.36	5.5
<b>aca-miRn7</b>	<b>AATGTCCAATCGTTGCAACTAAAT</b>	31.82	11
<b>aca-miRn8</b>	<b>TTTCATAATAAATGCAACACTTC</b>	16.36	6.6
<b>aca-miRn9</b>	<b>AAGTTCAACTCCAATCAGTTCAGT</b>	16.36	6.6
<b>aca-miRn10</b>	<b>CTTCTTCTCTGTTGGGAGCT</b>	18.18	7.7

#### 5.2.4.3 Expresión relativa y miRNAs de respuesta a estrés salino presentes en *A. canescens*.

El conteo de lecturas de miRNAs en las librerías secuenciadas puede ser utilizado como un índice que permite estimar la abundancia relativa o su nivel de expresión. Partiendo

de esto, las lecturas de miRNAs encontradas revelaron que 22 de los 107 miRNAs conocidos arrojaron cerca de 1,000 lecturas en ambas librerías y que 5 de ellos, aca-miR396a (142,662 lecturas), aca-miR166a (94,169 lecturas), aca-miR159a (36,245 lecturas), aca-miR535 (10,548 lecturas), y aca-miR168a (3,131 lecturas) estuvieron dentro de los más frecuentes. Resulta interesante observar que se presentaron cambios drásticos en la frecuencia de algunos miRNAs encontrados entre las librerías provenientes de las plantas utilizadas para el control y aquellas sometidas al tratamiento salino, donde dichos cambios podrían indicar que su expresión es regulada en respuesta al estrés salino. Para minimizar la interferencia entre las librerías solo los miRNAs entre 17 a 24 nt que presentaran lecturas normalizadas fueron seleccionados para efectuar las comparaciones. Según los criterios previamente expuestos, los miRNA con expresión relativa  $> 0.80$  y  $p < 0.05$  fueron designados como sobre expresados y aquellos con una expresión relativa de  $< 0.80$  y  $p < 0.05$  se denominaron como silenciados. Bajo condiciones de estrés salino, dos miRNAs pertenecientes a una misma familia fueron inhibidos y cuatro miRNAs pertenecientes a cuatro familias distintas, fueron sobre expresados (Figura 6). Estos resultados indican que el número de miRNAs sobre expresados en respuesta a las condiciones de estrés salino es mayor que aquellos que son inhibidos en estas mismas condiciones.

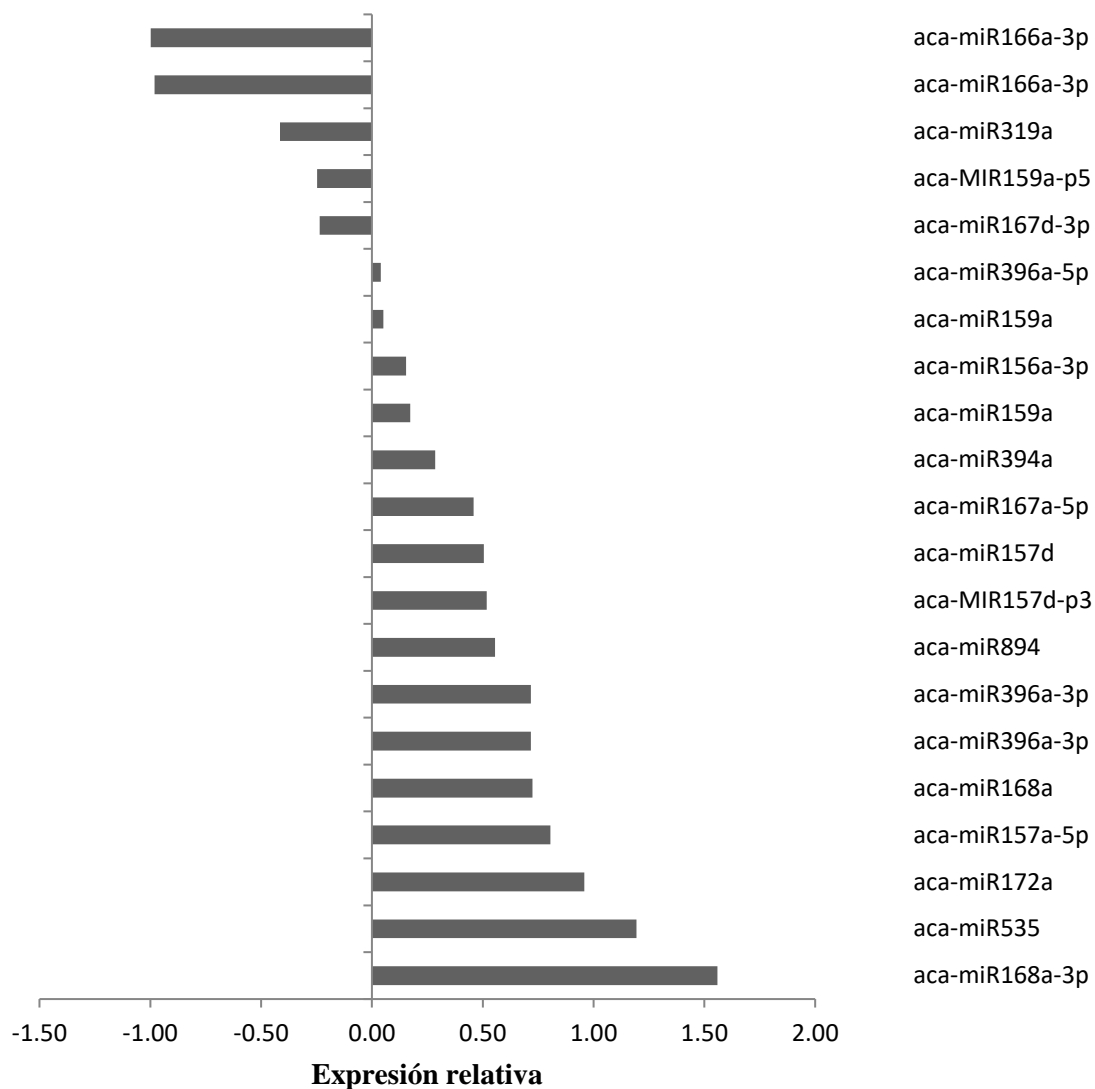


Figura 6. Nivel de expresión relativa de miRNAs conservados en *A. canescens* bajo condiciones de salinidad (250 mM de NaCl por 24 h). El eje X indica el nivel de expresión relativa normalizada calculada usando la formula  $\text{Log}_2$  (Número de lecturas bajo condiciones de salinidad/ Número de lecturas bajo condiciones control). El eje Y representa los miRNAs más frecuentes en *A. canescens*.

#### 5.2.4.4 Predicción de posibles dianas *in silico* y previamente corroborados experimentalmente presentes en *A. canescens*

Para identificar la función potencial de los miRNA responsivos a estrés salino, se determinaron, a través de una predicción por complementariedad y el uso de bibliografía, los genes diana para estos 14 miRNAs conservados, donde los resultados

más representativos se muestran en la tabla 1. Se ha reportado que estos genes están involucrados en diversos procesos fisiológicos tales como el desarrollo y el metabolismo de las plantas. Es importante señalar que diferentes miembros dentro de una misma familia de miRNA pueden tener el mismo gen blanco. Por ejemplo, ambos aca-miRNA166a y aca-miRNA166b, pueden tener como objetivo aquellos genes que codifican para la proteína Homeobox-leucine zipper, lo que nos indica que su secuencia está funcionalmente conservada. El mismo comportamiento se ha observado en el caso de aca-miRNA156a y aca-miRNA156b, los cuales tienen como objetivo los genes que codifican para la proteína de anclaje SPL (Squamosa promoter binding protein-like). Sin embargo, en el caso de aca-miR396a, se ha observado que este puede tener diferentes genes diana, por lo que sus funciones pueden estar diferenciadas por variaciones en 1 o 2 nt. *A. canescens* es una planta con alta tolerancia a la salinidad, por lo que estos miRNA responsivos ante el estrés salino podrían desempeñar un papel vital dentro de la adaptación a la salinidad. Se ha reportado que algunos miRNAs, como miR166, miR159, miR156 y miR319, encontrados en *Zea mays*, o miR393, miR397b y miR402, encontrados también en *Arabidopsis* sp., muestran una alteración en su perfil de expresión cuando son sometidos al estrés salino (Ding *et al.* 2009; Sunkar y Zhu 2006).

En el presente estudio, se encontró que aca-miRn1, un miRNA nunca antes reportado, sufrió una inhibición muy significativa en su expresión bajo condiciones de estrés salino (Tabla 2). A través del análisis *in silico*, se determinó que la secuencia es complementaria en un 98% en la región 3' del mRNA que codifica para el factor de transcripción HIG1/MYB51, el cual se ha reportado es un potente activador del gen PGDH1 (Gigolashvili *et al.* 2007), esta enzima participa en la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina plastidial, en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos, además de servir como ruta reguladora de la síntesis de metabolitos antioxidantes de respuesta a estrés como la L-prolina, betaína y el glutatión; sin embargo, el papel que juegan durante el estrés salino las isoformas enzimáticas de las PGDH aún sigue sin explorarse. Otro miRNA que mostró una sobreexpresión significativa, aca-miR168a, se ha confirmado experimentalmente que posee como diana la inhibición de la expresión de la proteína ARGONAUTE 1 (AGO1), la cual interesantemente regula la expresión de los genes



MIR, reprimiendo la función de DICER, lo que se ha ligado a la generación de una mejor estabilidad en los mRNAs durante el daño genómico causado por el estrés salino mejorando la resistencia a la salinidad en algunos cultivos de plantas (Ding *et al.* 2009). Los resultados anteriores, sugieren que los miRNAs pueden tener un rol importante en las principales adaptaciones de *A. canescens* frente a la salinidad, sin embargo, se necesitan investigaciones adicionales para confirmar las hipótesis anteriormente planteadas.

### 5.3 CAPÍTULO 3 “Función de la familia de genes PGDH durante el estrés salino en un modelo vegetal (*Arabidopsis thaliana* L.)”

#### 5.3.1 Resumen

Se han estudiado varios mecanismos relacionados con la respuesta de las plantas al estrés salino, uno de los más prometedores es la reprogramación metabólica, en la que podría estar implicada la L-serina (Ser). La biosíntesis de Ser en plantas se realiza principalmente por dos rutas: la Ruta del Glicolato y la Ruta Fosforilativa de Biosíntesis de Serina (RFBS). En *Arabidopsis*, la enzima PGDH está codificada por tres genes el *PGDH1*, *PGDH2* y *PGDH3*. Sin embargo, la función de cada isoforma de PGDH en la tolerancia de la planta a la salinidad sigue siendo desconocida. Se estudió el papel de los genes de la familia PGDH en la tolerancia de las plantas al estrés salino siguiendo un enfoque de ganancia y pérdida de función en *Arabidopsis thaliana*. Los resultados indican que la respuesta de los genes de la familia PGDH al estrés por salinidad depende del gen específico estudiado. El análisis de la expresión génica indicó que *PGDH1* y *PGDH2* fueron inducidos, mientras que *PGDH3* fue reprimido por estrés salino. Por consiguiente, los mutantes de *PGDH3* fueron más tolerantes, mientras que las plantas que sobreexpresaban *PGDH3* eran más sensibles a la salinidad que las plantas de tipo silvestre (WT). Por el contrario, las plantas que sobreexpresan *PGDH1* se desempeñaron mejor que el WT en condiciones de salinidad. Un estudio de metabolómica indicó que la sobreexpresión de *PGDH1* aumenta los niveles en la raíz de prolina y la rafinosa, menos de la mitad que en las plantas WT. Además, la proporción de glutatión oxidado (GSSG), con y sin estrés salino, fue la más alta en las líneas que sobreexpresan *PGDH1*, y la más baja en las líneas que sobreexpresan *PGDH3* en comparación con el WT. Todos estos resultados corroboraron que la actividad de *PGDH3* podría ser perjudicial, mientras que la actividad de *PGDH1* podría tener un efecto benéfico sobre la tolerancia a la salinidad de la planta. En condiciones de estrés salino, la sobreexpresión de *PGDH1* aumentó el contenido de Ser solo en las raíces, mientras que la sobreexpresión de *PGDH3* aumentó el nivel de aminoácidos en ambas partes aéreas (PA) y raíces, en comparación con el WT. Estos resultados sugieren que los aumentos en el contenido de Ser no siempre se correlacionan con una mayor tolerancia a la salinidad, y que se debe tener en cuenta el efecto del aminoácido en órganos/ tejidos específicos.

### 5.3.2 Introducción

El estrés salino compromete el crecimiento y desarrollo de las plantas. En particular, las plantas cultivadas son muy sensibles a las altas concentraciones de NaCl en el suelo y agua, lo que reduce considerablemente su productividad (Munns y Tester 2008). Las plantas han desarrollado varios mecanismos para hacer frente al estrés salino, incluidas algunas moléculas efectoras, sistemas de transporte que restablecen la homeostasis iónica, enzimas desintoxicantes y proteínas o enzimas reguladoras que controlan la cantidad y el tiempo de moléculas efectoras (Hasegawa *et al.* 2000; Zhu 2002, 2016; Munns y Tester 2008). Uno de estos mecanismos de respuesta a estrés a salinidad es la reprogramación metabólica. Se ha sugerido que los aminoácidos como la metionina y la cisteína están involucrados en la tolerancia del arroz al estrés salino (Mishra *et al.* 2016). Ambos aminoácidos se derivan de la L-serina (Ser), y la cisteína es el precursor del antioxidante glutatión. Además, hay evidencia que sugiere que el aminoácido Ser está involucrado en la respuesta de las plantas a diversas formas de estrés ambiental, como alta salinidad, inundaciones o bajas temperaturas (Ho y Saito 2001). Se ha reportado acumulación de Ser en plantas cultivadas a bajas temperaturas, sequía y alta salinidad (Kaplan *et al.* 2004; Bocian *et al.* 2015; Obata *et al.* 2015; Hossain *et al.* 2017; Li *et al.* 2017). Por ejemplo, bajo estrés salino, Ser se acumula en las raíces de soja de tipo silvestre (WT) en comparación con la soja cultivada sensible a la sal, en la que la salinidad reduce significativamente el crecimiento, la calidad y el rendimiento (Li *et al.* 2017). En condiciones de estrés por salinidad, Ser también se acumula en betabel, una de las plantas de cultivo más tolerantes a la salinidad también perteneciente a la familia Chenopodiaceae (Hossain *et al.* 2017).

La biosíntesis de Ser en plantas se realiza principalmente por dos rutas: la ruta del glicolato, que tiene lugar en las mitocondrias y se asocia con la fotorrespiración; y la ruta fosforilativa de biosíntesis de Serina (RFBS) (Ho *et al.* 1998, 1999a, 1999b; Ho y Saito 2001). En términos cuantitativos, se ha considerado que la ruta principal de la biosíntesis de Ser en plantas es la vía del glicolato (Figura 7). Dos enzimas clave participan en la biosíntesis de Ser a través de esta ruta: el complejo glicina descarboxilasa y Ser-hidroximetil transferasa (Figura 7). Una molécula de glicina se

descarboxila y se desamina en una reacción catalizada por el complejo de la glicina descarboxilasa con la consiguiente liberación de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  y la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ . La unidad de un carbono restante se transfiere a tetrahidrofolato, para formar metilen tetrahidrofolato, que reacciona con una segunda glicina para formar Ser en una reacción catalizada por Ser-hidroximetil transferasa (Figura 7).

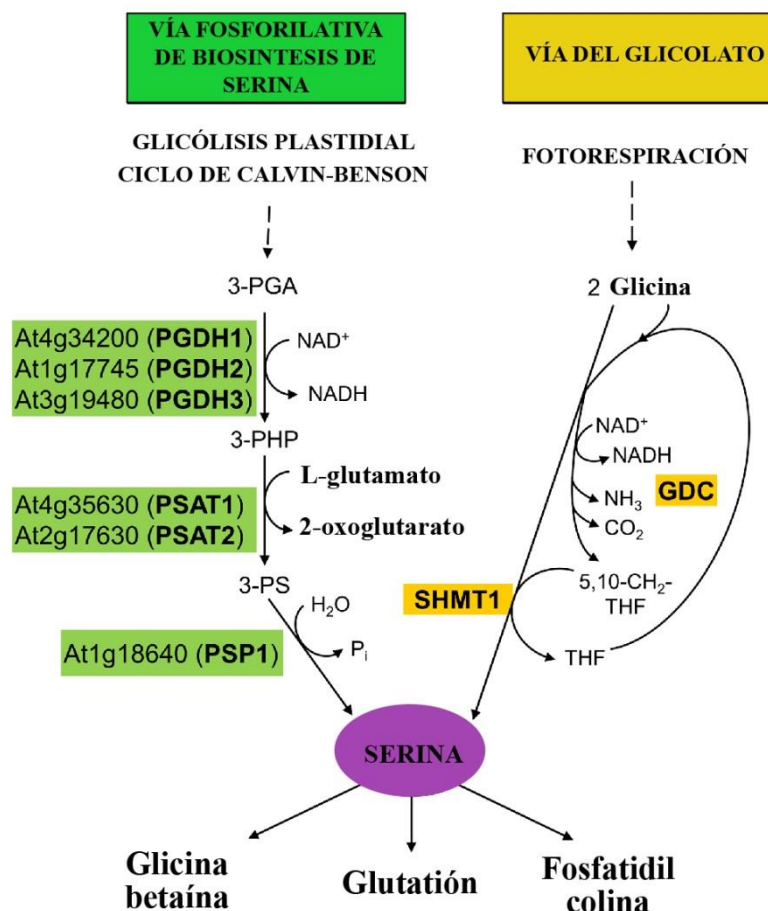


Figura 7. Representación esquemática de las rutas principales de biosíntesis de serina en plantas. Abreviaturas usadas para enzimas: PGDH, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa; PSAT, 3-fosfoserina aminotransferasa; PSP, 3-fosfoserina fosfatasa; GDC, Glicina descarboxilasa; SHMT, Ser-hidroximetil transferasa. Abreviaturas usadas para metabolitos: 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 3-PHP, 3-fosfohidroxipiruvato; 3-PS, 3-fosfoserina; 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, 5,10-metilen-tetrahidrofolato.

La RFBS, que se conserva en mamíferos y plantas, define un punto de ramificación para el 3-fosfoglicerato de la glucólisis plastidial e involucra tres enzimas que catalizan tres reacciones secuenciales: 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH), 3-fosfoserina

aminotransferasa (PSAT) y 3-fosfoserina Fosfatasa (PSP) (Figura 7). En *Arabidopsis*, tres genes codifican para PGDHs (At4g34200, *PGDH1*; At1g17745, *PGDH2*; At3g19480, *PGDH3*), dos para PSAT (At4g35630, *PSAT1*; At2g17630, *PSAT2*) y uno para PSP (At1g18640, *PSPI*). La caracterización funcional de los genes RFBS en *Arabidopsis* demostró que la ruta es esencial para el desarrollo de gametofitos y embriones masculinos, y también para el crecimiento de las raíces (Benstein *et al.* 2013; Cascales-Miñana *et al.* 2013; Toujani *et al.* 2013). Las tres isoformas codificadas por los genes *PGDH* tienen un porcentaje de identidad superior al 74% del nivel de aminoácidos (Toujani *et al.* 2013) y se ha demostrado que todas tienen actividad PGDH (Benstein *et al.* 2013). Sin embargo, sus propiedades enzimáticas son diferentes. Por ejemplo, la actividad *PGDH3* de *Arabidopsis* es más sensible a la inhibición por retroalimentación a través de Ser que *PGDH1*, mientras que *PGDH2* es insensible a Ser (Benstein *et al.* 2013). La familia PGDH también muestra un patrón de expresión génica muy específico en órganos, tejidos y células (Benstein *et al.* 2013, Toujani *et al.* 2013). Así, *PGDH1* y *PGDH2* se expresan en hojas, brotes, flores y silicuas, pero preferentemente en raíces, mientras que *PGDH3* se expresa altamente en hojas, pero no en raíces (Benstein *et al.* 2013, Toujani *et al.* 2013). Por último, también se ha informado que los mutantes knock-out de *PGDH1* son embrio-letales, mientras que los mutantes de *PGDH2* y *PGDH3* son viables (Cascales-Miñana *et al.* 2013; Toujani *et al.* 2013). Estas diferencias entre las isoformas de PGDH pueden sugerir funciones específicas para cada enzima en el metabolismo de las plantas, pero hasta la fecha sigue sin ser investigado.

La ingeniería metabólica, tanto de la ruta del glicolato como de la RFBS, se ha utilizado para mejorar la tolerancia a la salinidad de las plantas. La sobreexpresión de Ser-hidroximetil transferasa de la cianobacteria halotolerante *Aphanothece halophytica* en comparación con la cianobacteria de agua dulce *Synechococcus elongatus* PCC7942, resultó en una mayor tolerancia a la salinidad (Waditee-Sirisattha *et al.* 2017). Respecto a la RFBS, Waditte *et al.* (2007) sobreexpresaron el gen *PGDH* de la *Aphanothece halophytica* halotolerante en *Arabidopsis*. Se encontró que la sobreexpresión de PGDH de esta cianobacteria mejoró tanto la tasa de germinación como el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis* bajo estrés salino. También se ha demostrado que la actividad de

PGDH en betabel halotolerante aumenta en condiciones de estrés salino (Kito *et al.* 2017). Sin embargo, también se ha informado de que la expresión de uno de los genes *PGDH* del betabel (*BVPGDHa*) aumenta, mientras que la expresión de un segundo gen *PGDH* (*BvPGDH1b*) se reduce en condiciones de estrés salino (Kito *et al.* 2017). Estos resultados de la expresión génica obtenidos del betabel, junto con las diferentes propiedades de las enzimas de la familia PGDH en *Arabidopsis*, podrían sugerir que no todas las isoformas de PGDH tienen la misma función en la tolerancia al estrés salino. Sin embargo, la función de cada isoforma de PGDH en la respuesta de la planta a la salinidad sigue siendo desconocida. Concretamente, aún no se ha estudiado el efecto de la regulación ascendente o descendente de las isoformas de PGDH nativas y específicas en la tolerancia al estrés salino de las plantas. En este trabajo, se estudió exhaustivamente el papel de los genes de la familia PGDH en la tolerancia de las plantas al estrés salino siguiendo un enfoque de ganancia y pérdida de función en *Arabidopsis*. Se estudió el efecto específico de la sobreexpresión de tres isoformas de PGDH, así como de mutantes que carecen de *PGDH2* o *PGDH3*, ofreciendo nuevos enfoques sobre el efecto de los genes de la familia PGDH en la tolerancia salina en *Arabidopsis*.

### **5.3.3 Material y métodos**

#### **5.3.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0) fueron suministradas por el European Arabidopsis Stock Center (Scholl *et al.* 2000). *PGDH2* y *PGDH3* homocigotos mutantes *pgdh2-2* (SALK\_149747) y *pgdh3-2* (GK\_877F12) se obtuvieron previamente como se describe por Toujani *et al.* (2013). Las líneas de sobreexpresión de *PGDH1*, *PGDH2* y *PGDH3* se obtuvieron anteriormente transformando plantas de *Arabidopsis* WT con un constructo que lleva los respectivos cDNA de la familia PGDH bajo el control del promotor 35S, como lo describen Toujani *et al.* (2013).

Las semillas se esterilizaron y se sembraron en placas de fitoagar al 0.8% que contenían medio Murashige y Skoog (1/5 MS) con vitaminas Gamborg y 0,9 g / l de MES (ajustado a pH 5,7 con Tris). Después de un tratamiento de 4 días a 4°C, para coordinar la germinación, las placas se colocaron horizontalmente (ensayos de germinación) o

verticalmente (los otros experimentos), colocados en una cámara de crecimiento (IBERCEX, V350, España) a 22°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para los experimentos de germinación, algunas placas se complementaron con NaCl 100 mM y se determinó el porcentaje de semillas que habían germinado y desarrollado cotiledones expandidos completamente verdes. Para el crecimiento y la determinación de metabolitos, las semillas se cultivaron en 1/5 MS durante 6 días y luego las plántulas se transfirieron a un medio que contenía NaCl 75 mM durante 8 días adicionales. Algunas plántulas se transfirieron a medio de control (1/5 MS) durante el mismo período de tiempo como control.

### 5.3.3.2 q-RTPCR

Para el análisis de la expresión génica por qRTPCR, se utilizó la parte aérea (PA) y raíces de plantas WT de 14 días de edad, crecidas verticalmente en placas de 1/5 MS con o sin NaCl 75 mM. La qRTPCR se realizó como se describió anteriormente (Cascales-Miñana *et al.* 2013). Cada reacción se realizó por triplicado con 1  $\mu\text{L}$  del ADNc de la primera hebra en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ . Los datos son la media de al menos tres muestras biológicas. La especificidad de la amplificación por PCR se confirmó con una curva de disociación de calor (de 60°C a 95°C). Se calculó la eficiencia de la reacción de PCR y se seleccionaron diferentes estándares internos (Czechowski *et al.* 2005) dependiendo de la eficiencia de los cebadores. Los cebadores utilizados fueron: para *PGDH1*, cebador directo 5'- GTTGGGAGAATTGCACCGAG-3' y cebador reverso, 5'- GAGCTTGAGGAAAACGAACCTCCTC-3'; para *PGDH2*, cebador directo 5'- CATCAACTCCAATCGCCATTATC-3' y cebador reverso, 5'- GGACAGGTTGGTAACATACTTGG-3'; para *PGDH3*, cebador directo 5'- GCGTCCAACAACCTTAAGCC-3' y cebador reverso, 5'- CTTTGTACGAAGATCTCTCTTTGTG-3'; como cebadores estándar cebadores directos, 5'- ACCTGCGGTAATAACTGCATCTA-3' y 5'- GATGATATTGCAGTTTGTACCGT-3', cebadores reversos, 5'- CCGAACATCAACATCTGGGTC-3' y 5'- CACTGTCTTGCTTGTCTTGTCTG-3'. Los identificadores de los genes de *Arabidopsis* utilizados en este trabajo son los siguientes: At4g34200 (*PGDH1*); At1g17745 (*PGDH2*); At3g19480, (*PGDH3*).

### **5.3.3.3 Determinación de metabolitos y ensayos enzimáticos**

La parte aérea y raíces de las plantas WT de 14 días de edad y líneas de sobreexpresión, con y sin tratamiento con 75 mM de NaCl, se utilizaron para determinar el contenido de metabolitos en extractos de metanol derivatizado por GC-MS utilizando el protocolo definido por Lisec *et al.* (2006). Los metabolitos se identificaron comparando con los estándares de la base de datos (Kopka *et al.* 2005). Los cromatogramas y los espectros de masas se evaluaron con el software Chroma TOF 1.0 (LECO) y TagFinder 4.0 (Luedemann *et al.* 2008). El contenido de glutatión se midió con un espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización por electropulverización Z-spray y una columna C8 Kinetex (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) (Phenomenex, E.U.A.). Las muestras se prepararon según lo descrito por Asensi *et al.* (1999).

### **5.3.3.5 Análisis estadístico**

Los datos experimentales representan los valores medios y la desviación estándar (s), y la *n* representa el número de muestras independientes. Las diferencias significativas en comparación con las plantas WT se analizaron mediante una prueba de t Student (bilateral) utilizando Microsoft Excel. El análisis de componentes principales (ACP) se realizó con el software Metaboanalyst 4.0 (Chong 2018). Los valores se normalizaron con respecto a la media calculada para las plantas WT en condiciones control. Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron con un ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey HSD con el software IBM SPSS Statistics. El nivel de significancia se fijó en 5% (0.05).

## **5.3.4 Resultados y discusiones**

### **5.3.4.1 La expresión génica de la familia PGDH responde de manera diferencial al estrés salino**

En un primer intento de estudiar la función de los genes de la familia PGDH en la tolerancia al estrés salino de *Arabidopsis*, se evaluó el patrón de expresión de los tres genes PGDH en plantas WT cultivadas en presencia o ausencia de NaCl 75 mM. El estudio se realizó en aquellos órganos en los que los genes PGDH se expresan normalmente, es decir, para *PGDH1* y *PGDH2* en las partes aéreas (PA) y raíces, y en PA para *PGDH3* (Toujani *et al.* 2013). Tanto *PGDH1* como *PGDH2* se indujeron en PA



y raíces durante el tratamiento con estrés salino (Figura 8). Por el contrario, el tratamiento con NaCl reprimió la *PGDH3* en este último órgano (Figura 8). La diferente respuesta de los genes PGDH al estrés salino puede indicar que no cumplen la misma función en la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis*.

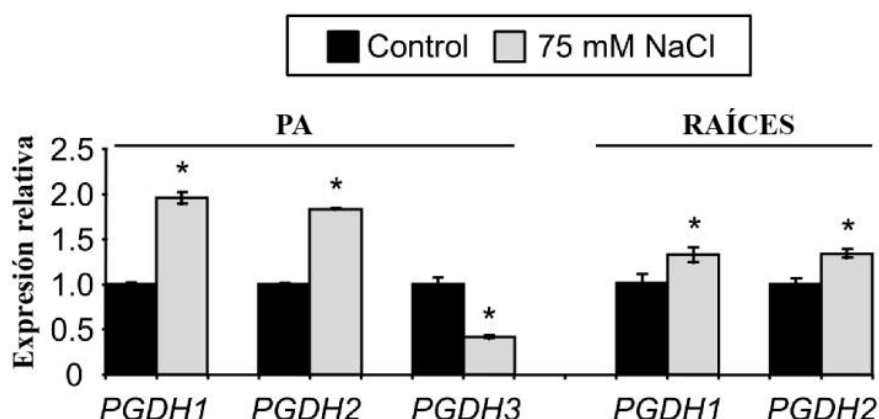


Figura 8. La familia de genes PGDH se expresan diferencialmente bajo estrés salino. Análisis qRT-PCR de la familia de genes PGDH en la parte aérea (PA) y raíces de plántulas WT de *Arabidopsis* cultivadas en medio MS 1/5  $\pm$  75 mM NaCl. Los datos (media  $\pm$  S; n = 3 repeticiones biológicas independientes) mostrados corresponden a los valores relativos normalizados con la media de la expresión calculada para plantas tipo silvestre (WT).

#### 5.3.4.2 La actividad PGDH no afecta la tasa de germinación durante el estrés salino

Con el fin de generar evidencia sobre el papel del gen de la familia PGDH en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino, se cuantificó el efecto del NaCl en algunos parámetros de crecimiento que se han descrito que se pueden mejorar a través de la sobreexpresión heteróloga de PGDH (Waditee *et al.* 2007), concretamente, la tasa de germinación y crecimiento (peso fresco (PF) y la tasa de crecimiento de la raíz primaria). Se evaluó la respuesta de las líneas de sobreexpresión de PGDH (Oex *PGDH1*, Oex *PGDH2*, Oex *PGDH3*) y la de los mutantes viables de PGDH (*pgdh2-2*, *pgdh3-2*) cuando se cultivan en presencia y ausencia de NaCl.

Para los experimentos de germinación, las semillas se sembraron en medio 1/5 MS con o sin NaCl 100 mM. Estos experimentos no mostraron una diferencia significativa en las tasas de germinación entre las plantas WT y los mutantes PGDH en ausencia o presencia de NaCl 100 mM (Figura 9A). Sin embargo, *pgdh3-2* mostró tendencia a una mayor tasa

de germinación que el WT en condiciones de estrés salino (Figura 9A). No se encontraron diferencias significativas en las tasas de germinación para las líneas de sobreexpresión de PGDH en condiciones de estrés salino o control en comparación con el WT (Figura 9B, C y D).

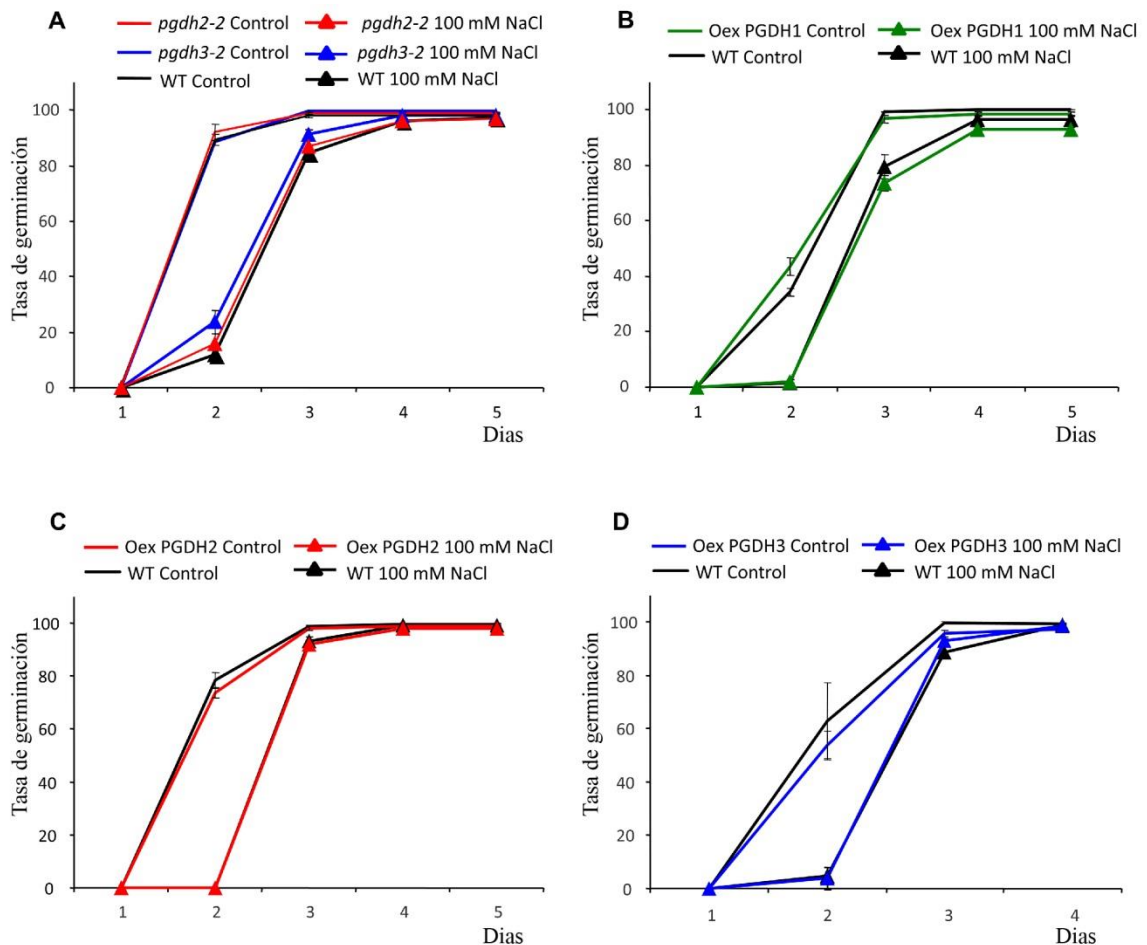


Figura 9. Tasa de germinación de plantas silvestres (WT), mutantes PGDH y líneas sobreexpresoras PGDH bajo condiciones de salinidad. Porcentaje de germinación de *pgdh2-2* (A), *pgdh3-2* (B) y líneas sobreexpresoras *PGDH1* (C) *PGDH2* (D) and *PGDH3* (E) con y sin 100 mM de NaCl en el medio. Los datos representan los valores medios  $\pm$  S; cada experimento consistió en al menos 4 placas con 60 semillas cada una. \*Valor  $P < 0.05$  comparado con el control de semillas WT.

La sobreexpresión heteróloga de la PGDH de *Aphanothece halophytica* en *Arabidopsis* mejora el crecimiento de la planta bajo estrés salino (Waditee *et al.* 2007). Esto podría indicar que la inducción de la actividad de la familia PGDH podría tener un efecto

benéfico sobre la tolerancia de las plantas a la salinidad. Los resultados obtenidos indican que la respuesta de los genes de la familia PGDH al estrés salino es mucho más complicada que esto, y se observan diferentes resultados según el gen específico que se esté estudiando. Se usaron varios parámetros para realizar la evaluación, estudiando la respuesta de *Arabidopsis* en diferentes etapas de desarrollo. No todos los parámetros proporcionaron información útil o responden de manera similar.

#### **5.3.4.3 Las isoformas de PGDH afectan de manera diferencial el crecimiento vegetal durante el estrés salino**

El crecimiento de las líneas de PGDH con pérdida o ganancia de función también se evaluó en condiciones de estrés salino. Para este objetivo, las plantas se cultivaron durante 6 días en medio control; seguido de esto, se transfirieron los diferentes grupos experimentales a un medio control o a un medio suplementado con NaCl 75 mM, durante 8 días más. El mutante *pgdh2-2* de *PGDH2* no mostró ninguna diferencia significativa en el PF relativo de la PA y las raíces bajo control o condiciones de estrés salino en comparación con las plantas WT (Figura 10A). Sin embargo, en el mutante *pgdh3-2* el crecimiento de la PA y el PF de la raíz fueron más bajos que el WT en condiciones control, revirtiéndose este cambio en condiciones de estrés salino (Figura 10A). Por lo tanto, en plantas cultivadas en presencia de NaCl 75 mM, el PF de *pgdh3-2* fue mayor que en las plantas WT, especialmente en la PA. En consecuencia, la relación PF, con y sin salinidad, fue significativamente mayor en *pgdh3-2* que en el WT. Este resultado indica que la ausencia de actividad de PGDH3 puede ser beneficiosa para las plantas bajo estrés salino, lo que concuerda con la expresión reducida de *PGDH3* en el WT bajo estas condiciones.

Como tendencia general, las líneas que sobreexpresan genes de la familia PGDH fueron más pequeñas que las WT cuando se cultivaron en placas de medio de control (Figura 10B, C y D). Por lo tanto, en todos excepto en una de las líneas Oex *PGDH2*, la PA y el PF relativo de la raíz de las líneas de sobreexpresión se redujeron significativamente en comparación con el WT. En condiciones de estrés salino, no todas las líneas de sobreexpresión tuvieron el mismo efecto en el crecimiento de las plantas. Mientras que Oex *PGDH2* y Oex *PGDH3* eran aún más pequeños que WT, las líneas Oex *PGDH1* no

siguieron esta tendencia. La reducción del PF bajo estrés salino fue particularmente marcada en las plantas que expresaban en exceso *PGDH3*. Por lo tanto, la proporción de PF con y sin sal se redujo drásticamente en las líneas Oex *PGDH3* en comparación con el WT (Figura 10D). Estos resultados contrastan con los encontrados en las líneas mutantes *pgdh3-2*, que se desempeñaron mejor que los controles en condiciones de estrés salino, y confirman que la actividad de PGDH3 puede ser perjudicial en lugar de benéfica en condiciones de estrés salino. Sin embargo, en las líneas Oex *PGDH1*, la proporción de PF con y sin sal fue significativamente mayor en PA y raíces en una de las líneas y se observó la misma tendencia en la segunda línea de sobreexpresión, lo que sugiere que PGDH1 podría tener un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas bajo estrés salino (Figura 10B).

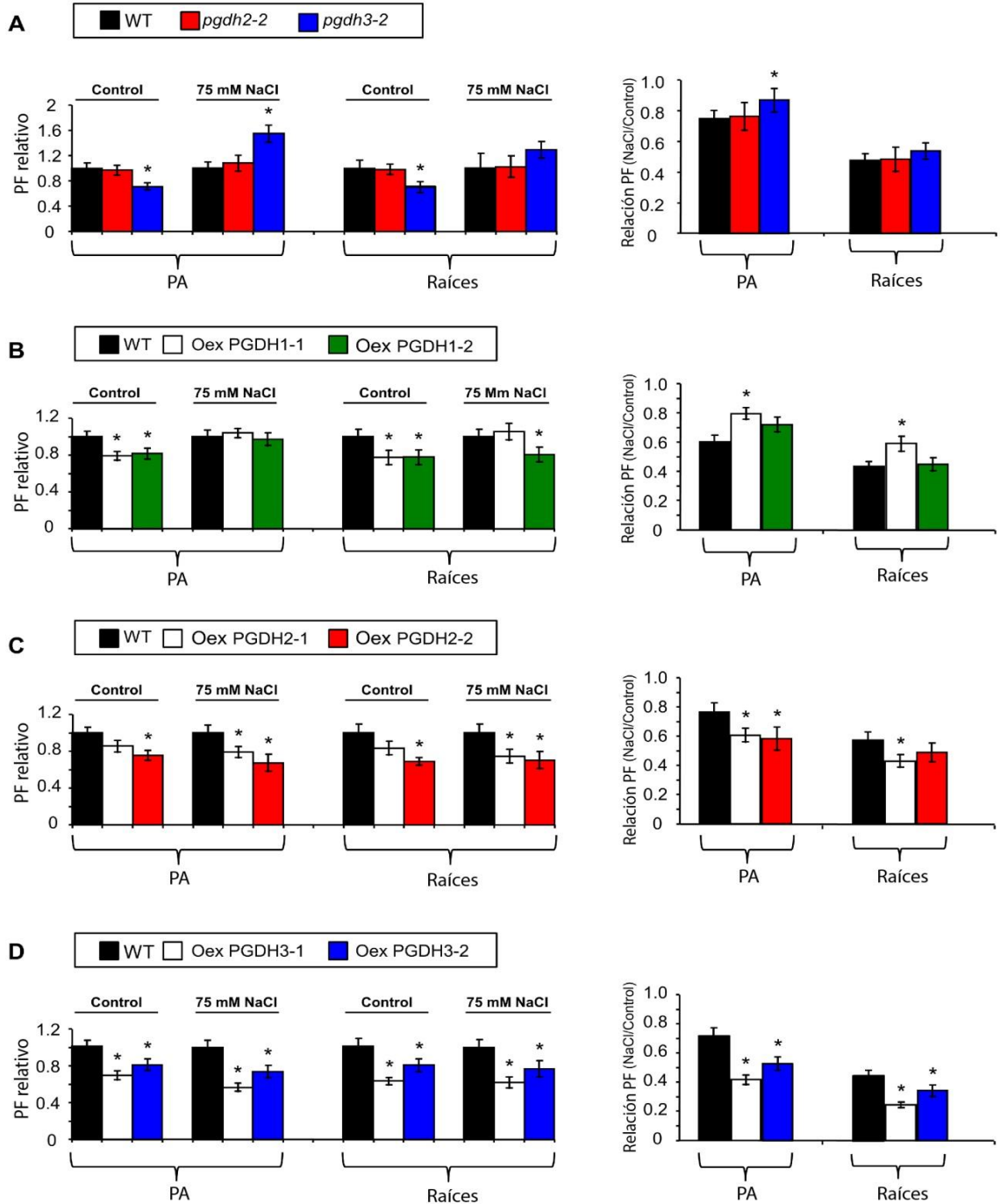


Figura 10. Peso fresco (PF) de la parte aérea (PA) y raíces de los mutantes y las líneas sobreexpresoras PGDH bajo condiciones de estrés salino. A) PF relativo de plántulas de líneas silvestres (WT) y los mutantes PGDH (*pgdh2-2* y *pgdh3-2*) en medio 1/5 MS  $\pm$  75 mM NaCl. La relación del PF con y sin tratamiento de salinidad también se muestra en la figura. En B), C) y D) muestran el PF relativo y la relación con su WT entre las líneas sobreexpresoras *PGDH1*, *PGDH2*, o *PGDH3* (dos eventos transgénicos independientes para cada gen) respectivamente; las plántulas fueron cultivadas en medio 1/5

MS  $\pm$  75 mM NaCl. Los datos mostrados representan el valor medio  $\pm$  S ( $n \geq 15$  réplicas biológicas independientes de grupos de 5 plantas). Los valores relativos se normalizaron con la media calculada para el WT \* Estadísticamente significativo al compararse con su WT ( $P < 0.05$ ).

Otro parámetro útil para estudiar el efecto del estrés salino en el crecimiento de las plantas es la inhibición del crecimiento de la raíz primaria (Zhu *et al.* 1998). Se cuantificó el efecto del estrés salino en la tasa de crecimiento de la raíz primaria de mutantes de PGDH y líneas de sobreexpresión. El crecimiento de las plantas en un medio con NaCl 75 mM redujo la tasa de crecimiento primario del control y de los mutantes de PGDH de manera similar (Figura 11A). Bajo condiciones de crecimiento control, la tasa de crecimiento de la raíz de las líneas de sobreexpresión no difirió significativamente de WT, aunque se observó una tendencia de tasa más baja en Oex *PGDH2* y Oex *PGDH3* (Figura 11B, C y D). Esta tendencia fue significativamente menor cuando las plantas se cultivaron en presencia de NaCl 75 mM. En las líneas Oex *PGDH1*, el tratamiento con salinidad solo redujo significativamente la tasa de crecimiento de una línea, mientras que la otra tuvo tasas de crecimiento similares a WT (Figura 11B). A partir de estos resultados, se llegó a la conclusión de que la actividad de la PGDH no tiene un efecto benéfico sobre el crecimiento de la raíz primaria bajo estrés salino, y que la sobreexpresión de las isoformas de la *PGDH2* y la *PGDH3* puede ser perjudicial, como lo sugieren las mediciones de PF previamente.

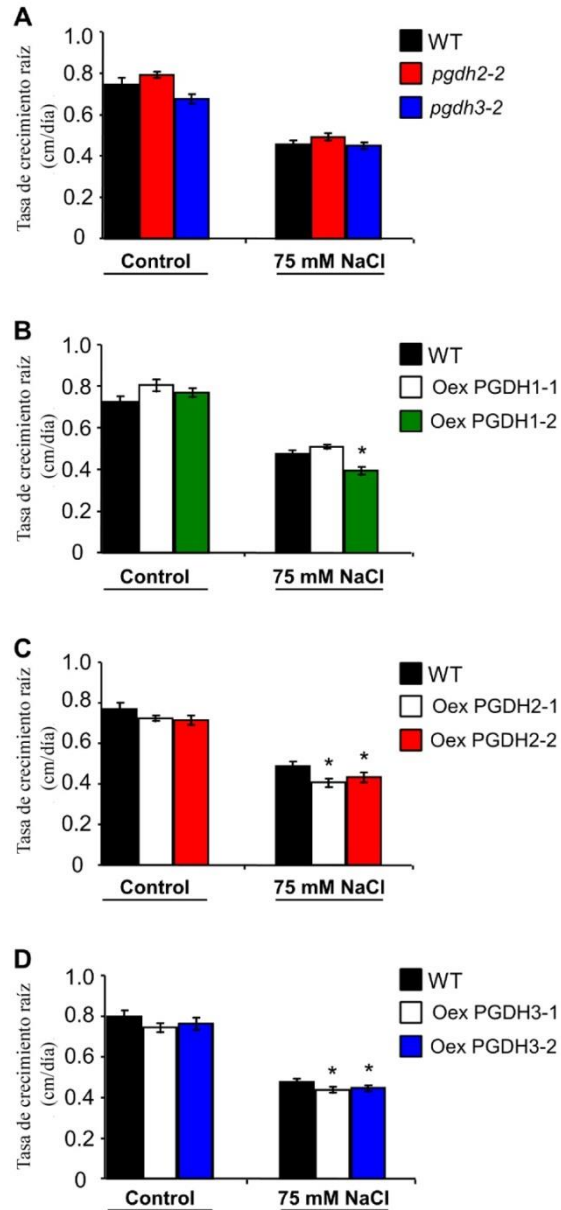


Figura 11. Tasa de crecimiento primario de la raíz de mutantes PGDH y líneas sobreexpresoras bajo estrés salino. A) Tasa de crecimiento de la raíz primaria de las líneas silvestres (WT) y mutantes PGDH (*pgdh2-2* and *pgdh3-2*), plántulas cultivadas en medio MS 1/5  $\pm$  75 mM NaCl. En B), C) y D) la tasa de crecimiento de la raíz primaria de las líneas sobreexpresoras *PGDH1*, *PGDH2*, o *PGDH3* (dos eventos transgénicos independientes para cada gen) respectivamente; las plántulas fueron cultivadas en medio 1/5 MS  $\pm$  75 mM NaCl. Los datos mostrados representan el valor medio  $\pm$  S ( $n \geq 15$  réplicas biológicas independientes de grupos de 5 plantas). Los valores relativos se normalizaron con la media calculada para el WT \* Estadísticamente significativo al compararse con su WT ( $P < 0.05$ ).

De los tres parámetros estudiados (tasa de germinación, peso de los órganos aéreos y crecimiento primario de la raíz), el más útil para evaluar la tolerancia a la salinidad de la PGDH es el cambio de peso. La falta de función de *PGDH2* no causó ningún cambio significativo en el crecimiento bajo condiciones control o estrés por salinidad, incluso si el gen está altamente inducido por el tratamiento en plantas WT. Esto podría atribuirse a una redundancia funcional entre *PGDH1* y *PGDH2*, ya que su patrón de expresión génica es muy similar, y ambos son inducidos por el estrés salino. Sin embargo, la falta de actividad de PGDH3 alteró los parámetros de crecimiento del mutante en comparación con las plantas WT, tanto en condiciones control como de estrés por salinidad. Por lo tanto, el mutante *pgdh3-2* era más pequeño que su WT bajo condiciones de control. Estos resultados sugieren que la actividad de PGDH3 no puede ser compensada por la expresión de las otras isoformas, lo que podría explicarse por el diferente patrón de expresión génica de esta isoforma en comparación con *PGDH1* y *PGDH2*. Los fenotipos *pgdh3-2* más drásticos se encontraron en la PA, lo que concuerda con la alta expresión del gen en este órgano en las plantas WT. Inesperadamente, *pgdh3-2* creció mejor que el WT en condiciones de estrés salino. La represión de *PGDH3* en las plantas WT bajo estrés salino podría explicar este fenotipo. *PGDH3* pertenece al mismo grupo de homología que el gen de betabel *BVPGDHb*, que también se reprime bajo estrés salino. La mejor tolerancia a la salinidad en *pgdh3-2* y la represión de *PGDH3* por estrés salino indican claramente que la ausencia de actividad de PGDH3, en lugar de su presencia, podría ser beneficiosa para las plantas bajo estrés salino.

Además, los resultados obtenidos con las líneas de sobreexpresión confirman que no todas las isoformas de PGDH tienen el mismo efecto sobre la tolerancia a la salinidad. Si bien la sobreexpresión de *PGDH1* mejoró la tolerancia a estrés salino, este efecto positivo no se observó al sobreexpresar *PGDH2* y *PGDH3*. De hecho, la sobreexpresión de *PGDH3* claramente tuvo un efecto negativo en el crecimiento de la planta en condiciones de salinidad, lo que concuerda con el aumento del crecimiento observado en *pgdh3-2*. Por lo tanto, bajo estrés salino, *PGDH1* y *PGDH3* parecen tener diferentes funciones. Este comportamiento diferente de las plantas que sobreexpresan *PGDH1* y *PGDH3* bajo estrés salino, se ve corroborado por los patrones de expresión del gen WT bajo estas condiciones, y podría tener relevancia biológica.



#### **5.3.4.4 La sobreexpresión de isoformas PGDH alteran la expresión de metabolitos de respuesta a estrés**

Con el fin de investigar qué cambios en los metabolitos podrían explicar la diferente respuesta de crecimiento de *PGDH1* y *PGDH3* bajo estrés salino, se realizó un estudio metabolómico de las líneas Oex *PGDH1* y Oex *PGDH3*. Para este propósito, las plantas se cultivaron en las mismas condiciones descritas para la evaluación del crecimiento. El perfil de metabolitos de las plantas cultivadas bajo estrés salino se comparó con el de los controles WT sin tratamiento.

El análisis de los metabolitos de las líneas cultivadas en medio control mostró que se observaron cambios importantes entre el WT y las líneas de sobreexpresión en raíces (Figura 12A). En la PA de ambas líneas Oex, ninguno de los 23 metabolitos analizados aumentó más de 2 veces en comparación con el WT. Aun así, Ser aumentó 1.7 y 1.9 veces en Oex *PGDH1* y Oex *PGDH3* en comparación con WT, respectivamente (Figura 12A). El cambio más importante observado en las raíces de las líneas de sobreexpresión bajo condiciones control fue la acumulación de Ser. Esta acumulación fue mucho más pronunciada en la línea Oex *PGDH1*, donde los niveles de Ser aumentaron en más de 7 veces en comparación con el WT. Estos resultados indicaron que la sobreexpresión de ambas isoformas de PGDH aumentó el contenido de Ser en la PA y raíces, pero con una eficiencia diferente según el órgano estudiado.

El ACP mostró una separación marcada entre las líneas y el WT en condiciones control y en salinidad (Figuras 12B y C). El Oex *PGDH1* también se separó claramente de las líneas WT y Oex *PGDH3*, especialmente en las raíces. Además, se investigó qué metabolitos podrían explicar principalmente estos cambios en el rendimiento. Se encontró que los niveles de Ser y prolina fueron más afectados en la PA, mientras que este fue el caso de Ser, prolina, glutamina y rafinosa ocurrió en las raíces. En condiciones de estrés salino, los niveles de Ser aumentaron hasta 3 veces en el PA de las plantas WT en comparación con las WT cultivadas en condiciones estándar (Figura 12A). El contenido de Ser en ambas líneas Oex también aumentó en comparación con las líneas WT en condiciones estándar, pero se observaron diferencias entre las líneas.

Por lo tanto, las líneas Oex *PGDH3* mostraron el mayor contenido de Ser, que fue significativamente diferente al de las WT y Oex *PGDH1*. La prolina, un metabolito que se acumula en condiciones de estrés salino (Verslues y Sharma 2010; Obata y Fernie 2012), aumentó drásticamente en la PA de las plantas WT en el tratamiento con sal (6.5 veces más) en comparación con las condiciones de control. En ambas líneas, Oex *PGDH1* y Oex *PGDH3*, la prolina también aumentó, pero el incremento fue significativamente menor en las líneas Oex *PGDH1* que en las líneas WT u Oex *PGDH3*.

Los cambios más drásticos observados en el tratamiento con sal se observaron en las raíces (Figura 12A). El contenido de Ser aumentó hasta 8 y 12 veces en las líneas WT y Oex *PGDH3* respectivamente, y hasta 17 veces en Oex *PGDH1* en comparación con el WT en condiciones estándar. A diferencia de Ser, el contenido de prolina y rafinosa no aumentó tan drásticamente en Oex *PGDH1* en comparación con el WT u Oex *PGDH3*. Por lo tanto, la prolina aumentó hasta 20 veces en el WT y Oex *PGDH3*, pero menos de 10 veces en Oex *PGDH1*. La rafinosa, otro marcador de estrés abiótico (Sengupta *et al.* 2015, Obata y Fernie 2012), aumentó más de 5 veces en el WT y Oex *PGDH3*, pero solo 3 veces en Oex *PGDH1*. Finalmente, los niveles de glutamina-glutamato, que se han relacionado con el metabolismo de la prolina (Verslues y Sharma 2010) fueron significativamente más altos en Oex *PGDH3* que en el WT y Oex *PGDH1* (Figura 12A).

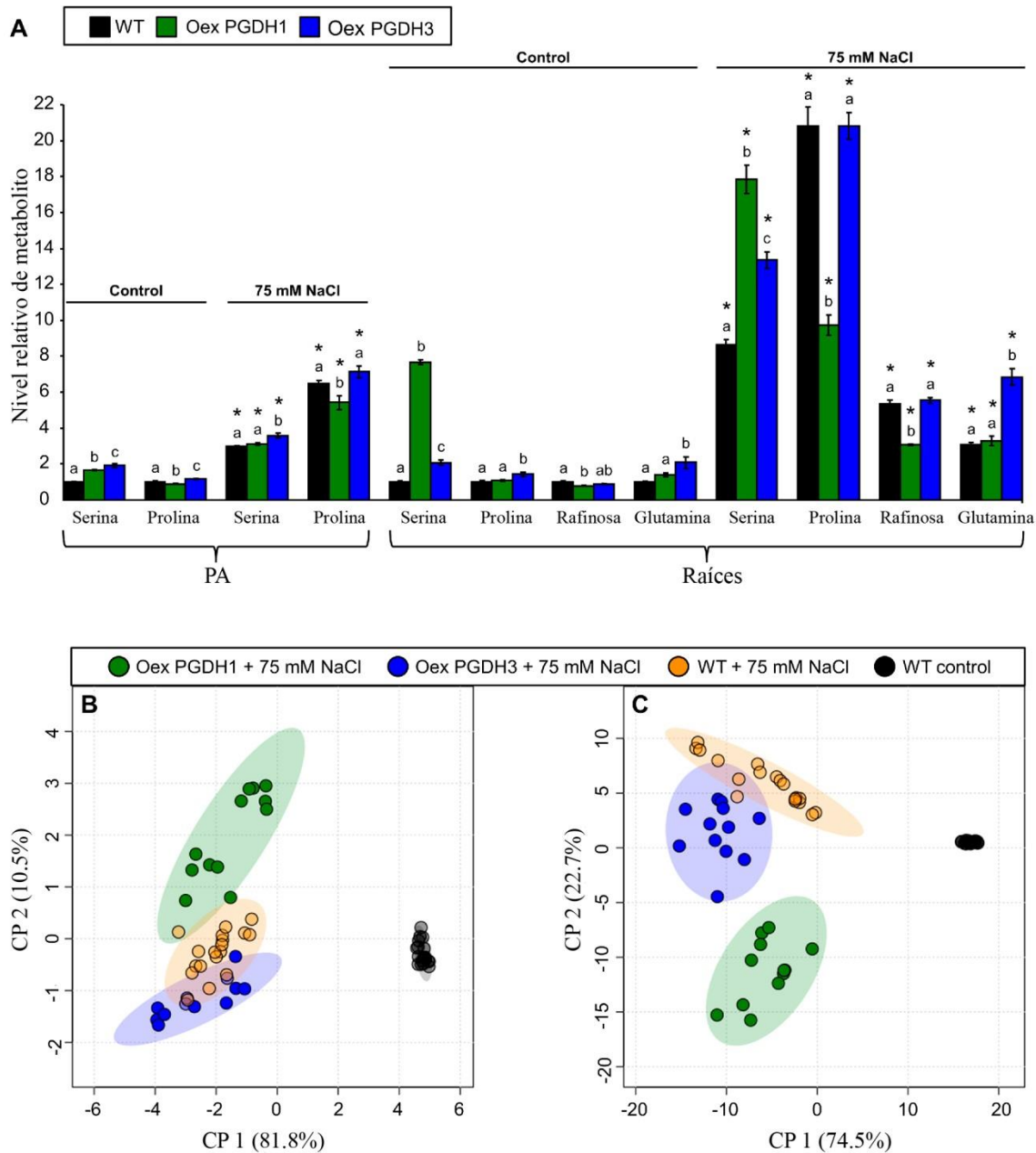


Figura 12. La sobreexpresión de las isoformas PGDH afecta diferencialmente el metabolismo bajo estrés salino. A) Lista de metabolitos más afectados en la parte aérea (PA) y en raíces de las líneas WT, y líneas sobreexpresoras *PGDH1* (Oex PGDH1) y *PGDH3* (Oex PGDH3). Los datos fueron normalizados utilizando la media de respuesta calculada para las líneas WT creciendo en medio control. Los datos representan los valores medios  $\pm$  S de al menos 12 determinaciones independientes para las líneas Oex y 18 determinaciones independientes para las líneas WT. Las plantas transgénicas proceden de la mezcla de dos eventos transgénicos. \* Estadísticamente significativo al compararse con su WT ( $P < 0.05$ ). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las líneas creciendo bajo las mismas condiciones

( $P < 0.05$ ). B) y C) Análisis de componentes principales (APC) del perfil de metabolitos en la parte aérea (PA; B) y raíces (C) de las líneas WT y sobreexpresoras (Oex), cultivadas en 75 mM NaCl y comparadas con su respectivo WT en medio control. Los valores en paréntesis indican la contribución relativa de cada componente en relación a la varianza observada para cada conjunto de datos.

Los cambios en el nivel de Ser en ambas líneas Oex, el precursor de la cisteína requerido para la biosíntesis del glutatión, junto con las modificaciones en los contenidos de glutamina/glutamato, también requeridos para el metabolismo del glutatión, llevaron a investigar si la homeostasis de este importante metabolito se alteró en las líneas estudiadas. En la PA de las líneas Oex *PGDH1* y Oex *PGDH3* cultivadas en condiciones de control, el nivel de glutatión reducido (GSH) fue mayor que en el WT (Figura 13A), que se correlacionó con el nivel alto de Ser presente en ambas líneas. Bajo condiciones de estrés por salinidad, solo Oex *PGDH3* mostró niveles más altos de GSH (Figura 13A), una vez más correlacionando los niveles altos de Ser y GSH en estas líneas Oex. Sin embargo, los niveles de glutatión oxidado (GSSG) también aumentaron dramáticamente en la PA de las líneas Oex *PGDH3*, un aumento de aproximadamente 70% en GSSG en comparación con el WT, (Figura 13B), lo que llevó a una caída significativa en el ratio GSSG con y sin salinidad (Figura 13C).

En las raíces de plantas cultivadas en condiciones control, los niveles de GSH fueron solo significativamente más altos en las líneas Oex *PGDH1* (Figura 13A), que se correlacionaron con los niveles altos de Ser presentes en estas líneas. En condiciones de estrés salino, ambas líneas Oex mostraron niveles de GSH más altos que el WT, lo que una vez más coincide con los niveles de Ser que se encuentran en estas líneas. Al igual que en la PA, los niveles de GSSG en condiciones de estrés salino, fueron significativamente más altos solo en las líneas Oex *PGDH3* en comparación con el WT (Figura 13B). Finalmente, se observó una tendencia a una disminución en la proporción de GSSG con o sin tratamiento de salinidad en estas líneas (Figura 13C). Por el contrario, esta relación aumentó significativamente en las líneas Oex *PGDH1*.

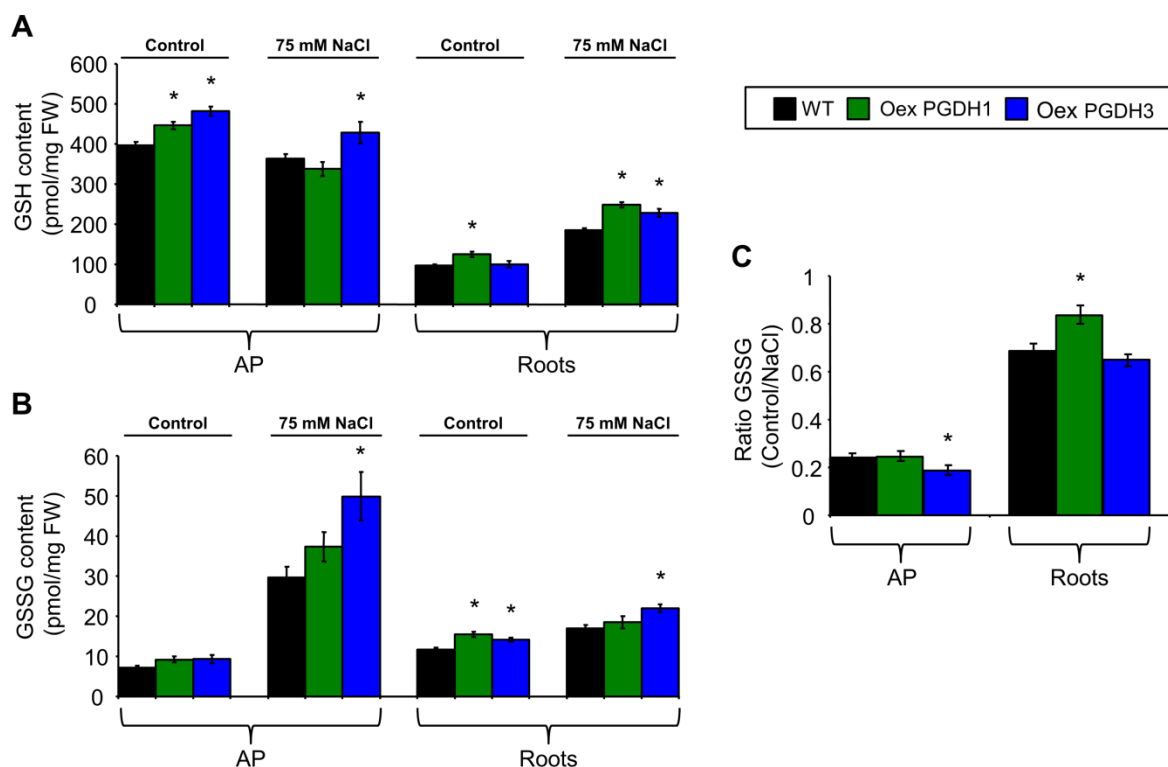


Figura 13. El metabolismo del glutatión es alterado diferencialmente por la sobreexpresión de las diferentes isoformas PGDH bajo condiciones de estrés salino. A) Contenido de glutatión reducido (GSH) en la parte aérea (AP) y raíces de las líneas silvestres WT y sobreexpresoras PGDH (Oex *PGDH1* y Oex *PGDH3*) cultivadas en medio 1/5 MS  $\pm$  75 mM NaCl. B) Contenido de glutatión oxidado (GSSG) en la parte aérea (AP) y raíces de las líneas silvestres WT y sobreexpresoras PGDH (Oex *PGDH1* y Oex *PGDH3*) cultivadas en medio 1/5 MS  $\pm$  75 mM NaCl. C) Relación de GSSG con y sin tratamiento de salinidad. Los valores representan la media  $\pm$  S de al menos 6 determinaciones independientes conformadas por mezclas de 30 plantas. Las plantas transgénicas provienen de dos eventos transgénicos diferentes. \* Diferencia significativa con respecto a su WT en medio control ( $P < 0.05$ ).

Los hallazgos obtenidos, mostraron que los niveles de Ser en *Arabidopsis* aumentan con el tratamiento de estrés salino, lo que corrobora estudios previos que indican que este metabolito podría desempeñar un papel en el reordenamiento metabólico asociado con la respuesta de tolerancia a la salinidad de la planta (Ho y Saito 2001; Bocian *et al.* 2015; Hossain *et al.* 2017; Li *et al.* 2017). Sin embargo, el mecanismo por el cual Ser está relacionado con la respuesta a la tolerancia a la salinidad todavía no se ha esclarecido. Ser podría mejorar la tolerancia debido al aminoácido en sí, o a un derivado de Ser, como la glicinbetaína o el glutatión. Como se mencionó anteriormente, Waditee *et al.*

(2007) diseñaron una estrategia para aumentar el contenido de betaína de *Arabidopsis* en un intento por mejorar la tolerancia a la salinidad de la planta y estrés por frío. Estos autores transfirieron la enzima PGDH de la cianobacteria *Aphanothece halophytica* a las plantas de *Arabidopsis*, en las cuales la vía sintética de la betaína se introdujo previamente a través de la metilación de la glicina. Asumieron que la sobreexpresión de la PGDH aumentaría la disponibilidad del precursor Ser para la vía de metilación de la glicina. Demostraron que la sobreexpresión de PGDH aumentó la tolerancia al estrés salino y frío, no solo en las plantas diseñadas con la vía sintética de betaína, sino también en las plantas WT. En otro estudio, Waditee-Sirisattha *et al.* (2017), encontraron que la tolerancia aumentada conferida por la sobreexpresión de Ser-hidroximetil transferasa de la cianobacteria halotolerante *Aphanothece halophytica* en la cianobacteria de agua dulce *Synechococcus elongatus* PCC7942 no se asocia con un aumento en el contenido de Ser. Como *Synechococcus elongatus* no sintetiza glicinebetaína, el aumento de la tolerancia salina tampoco se debió a la acumulación de este metabolito. Entonces Ser podría mejorar la tolerancia salina a través de cambios en otros metabolitos derivados. Por ejemplo, Ser es un precursor de la cisteína que, a su vez, es un precursor del glutatión. También se ha reportado que el glutatión confiere tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis* (Cheng *et al.* 2015).

Para comprender los diferentes efectos de la sobreexpresión de *PGDH1* y *PGDH3* en la tolerancia de la planta a la salinidad, se realizó un estudio de metabolómica. Este estudio indicó que los marcadores de estrés de metabolitos, como prolina y rafinosa (Verslues y Sharman 2010; Sengupta *et al.* 2015; Obata y Fernie 2012), se acumulan más en las líneas Oex *PGDH3* y menos en la línea Oex *PGDH1* que en el WT bajo condiciones de estrés salino. Estas diferencias fueron más agudas en las raíces que en la PA, donde el tratamiento con salinidad desencadenó los cambios metabólicos más relevantes. Los niveles bajos de prolina y rafinosa en raíces de la línea Oex *PGDH1* en comparación con las otras líneas, sugieren que estas líneas sufren menos estrés que el WT u Oex *PGDH3* cuando se cultivan en altas concentraciones de NaCl. Esta idea también está respaldada por las relaciones más altas de GSSG con y sin tratamiento de salinidad mostrado por las líneas Oex *PGDH1*, que fue lo contrario al observado en las líneas Oex *PGDH3*.

Los niveles de Ser tanto en la PA como en las raíces de las líneas de sobreexpresión cambiaron en comparación con el WT, sin embargo, se observaron también diferencias entre las líneas Oex. Las líneas Oex *PGDH3* acumularon más Ser que el WT en la PA y en las raíces en condiciones de estrés salino y estándar. El Oex *PGDH1*, acumuló claramente más Ser que el WT y Oex *PGDH3* en las raíces de plantas cultivadas en condiciones control y de estrés salino. Sin embargo, los niveles de Ser fueron similares a los del WT en la PA de las plantas tratadas con salinidad. Estos resultados sugieren que los niveles altos de Ser en las raíces probablemente se correlacionan con un mejor crecimiento bajo estrés salino, mientras que los niveles altos de aminoácidos en la PA podrían ser perjudiciales para el crecimiento. Este alto nivel de Ser en la PA podría explicar el crecimiento reducido de Oex *PGDH3* en condiciones de estrés salino, así como el de Oex *PGDH1* y Oex *PGDH3* en condiciones de control. Por lo tanto, la diferente distribución de Ser en la PA y raíces podría proporcionar una pista de por qué las líneas Oex *PGDH1* son más tolerantes y las Oex *PGDH3* son más sensible al estrés salino. Quizás, el Ser adicional proporcionado por Oex *PGDH1* en las raíces es importante para la tolerancia salina, mientras que el exceso de Ser en la PA, donde la ruta del glicolato también es activa, podría alterar la regulación del metabolito en este órgano y tener un efecto perjudicial tanto en condiciones estándar como de estrés salino.

Aunque tanto *PGDH1* como *PGDH3* se sobreexpresaron bajo el control del promotor 35S, el cual conduce a una fuerte expresión en las raíces y la PA, los aumentos finales en el contenido de Ser en las líneas de sobreexpresión coincidieron con la expresión fisiológica de estas isoformas bajo el control de su promotor nativo. Este resultado indica que existen diferentes mecanismos postranscripcionales, traslacionales y postraduccionales que regulan ambas isoformas, probablemente como respuesta para mantener la homeostasis metabólica, y afectan los niveles finales de *PGDH1* y *PGDH3* y su actividad en la planta. Sin embargo, el hecho de que la expresión de *PGDH3* se reprima mientras que la *PGDH1* está regulada por la salinidad, sugiere que la regulación transcripcional puede, al menos, formar parte de la respuesta de estrés salino de la familia de PGDH en plantas WT.

Los patrones de regulación y los cambios metabólicos observados en las líneas de sobreexpresión podrían estar relacionados con las funciones fisiológicas de PGDH1 y PGDH3. *PGDH1* se expresa preferencialmente en las raíces y suministra Ser a los tejidos heterótrofos, donde la fuente más importante de Ser proviene de la RFBS. *PGDH3* se expresa altamente en hojas y su actividad podría estar estrictamente coordinada con la de las otras enzimas de la vía del glicolato, que se considera la principal fuente de Ser para estos tejidos. La sobreexpresión de *PGDH3* podría afectar dicha coordinación.



## 6. CONCLUSIONES

*Atriplex canescens* logra crecer y desarrollarse de manera óptima a una concentración de 250 mM de NaCl. Sin embargo, a pesar de desarrollarse rápidamente, presenta una mayor susceptibilidad a la salinidad durante sus primeras etapas de establecimiento.

*Atriplex canescens* posee un mecanismo de exclusión de iones muy desarrollado compuesto principalmente por tricomas glandulares, glándulas que requieren un estímulo continuo de salinidad de al menos 24h lo que también trae consigo la reducción del área de exposición estomática, evitando la pérdida de agua en ambientes desérticos.

La composición química de la superficie de los tricomas de *A. canescens* nos indica que la compartimentalización es un proceso sumamente organizado en el cual el magnesio y el potasio juegan un papel crucial en el secuestro y cristalización del ion sodio.

Se documentaron un total de 107 miRNA conservados en *A. canescens*, 14 de ellos mostraron una respuesta diferencial ante condiciones de estrés salino así como una interacción con 141 genes blanco, donde la mayoría de estas dianas moleculares corresponden a factores de transcripción o “genes maestros”.

Se descubrieron 563 nuevos miRNAs nunca antes reportados para el reino vegetal, donde uno de estos nuevos miRNAs se le nombró aca-miRn1, el cual presenta una complementariedad del 98% con HIG1/MYB51, un gen maestro que controla la expresión de dos isoformas de enzimas PGDH, las cuales se han vinculado a la regulación de la expresión de metabolitos de respuesta a estrés como la L- prolina, betaína y glutatión. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para explorar la función e interacción de estos genes durante el estrés salino.

El papel que desempeña Ser en la tolerancia de las plantas al estrés abiótico podría involucrar múltiples factores, incluidos diferentes metabolitos derivados como el glutatión, pero también distintos compartimientos. Estos resultados indican que la

respuesta de los genes de la familia PGDH al estrés salino es compleja y que cada isoforma podría realizar diferentes funciones. Mientras que la actividad de PGDH1 puede resultar relevante para la tolerancia de la planta a la salinidad, la función de PGDH3 parece perjudicial en tales condiciones ambientales.

## 7. PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio podrían proporcionar información relevante para la futura validación del rol de los miRNAs como reguladores de la respuesta ante el estrés salino, así como facilitar la descripción de los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación a la salinidad en plantas. A medida que se describen más miRNAs relacionados a la tolerancia a condiciones salinas, los miRNAs artificiales se convierten en una poderosa y novedosa herramienta que permitirán generar germoplasma vegetal capaz de poseer una alta resistencia a la salinidad.

Por otra parte, a la luz de esta información, la función de *PGDH3* en plantas no está bien definida. El hecho de que se exprese principalmente en tejidos autótrofos donde está presente la vía del glicolato también plantea ciertas dudas sobre su función en el suministro de Ser a dichos tejidos, al menos en horas diurnas. Estudios futuros serán necesarios para resolver esta cuestión.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Apóstolo NM. 2005. Caracteres anatómicos de la vegetación costera del Río Salado (Noroeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 40:215–227.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Lloret A, Lehner M, Garcia-de-la Asuncion J, Vina J. 1999. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. Methods in Enzymology 299:267-276.
- Aslam Z, Jeschke WD, Barrett-Lennard EG, Setter TL, Watkin E, Greenway H. 1986. Effects of external NaCl on the growth of *Atriplex amnicola* and the ion relations and carbohydrate status of the leaves. Plant Cell Environment 9:571–580.
- Benstein RM, Ludewig K, Wulfert S, Wittek S, Gigolashvili T, Frerigmann H. 2013. Arabidopsis Phosphoglycerate Dehydrogenase1 of the Phosphoserine Pathway Is Essential for Development and Required for Ammonium Assimilation and Tryptophan Biosynthesis. Plant Cell 25:5011–5029. doi: tpc.113.118992 [pii]10.1105/tpc.113.118992
- Bocian A, Zwierzykowski Z, Rapacz M, Koczyk G, Ciesiolka D, Kosmala A. 2015. Metabolite profiling during cold acclimation of Lolium perenne genotypes distinct in the level of frost tolerance. Journal of Applied Genetics 56:439–449. doi: 10.1007/s13353-015-0293-6
- Breckle SW, Freitas H, Reimann C. 1990. Sampling *Atriplex* bladders: a comparison of methods. Plant Cell Environment 13:871–873.
- Cascales-Miñana B, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Anoman AD, Pertusa J, Alaiz M. 2013. The Phosphorylated Pathway of Serine Biosynthesis Is Essential Both for Male Gametophyte and Embryo Development and for Root Growth in Arabidopsis. Plant Cell Online. doi: 10.1105/tpc.113.112359
- Chen L, Ren Y, Zhang Y, Xu J, Sun F, Zhang Z. 2012. Genome-wide identification and expression analysis of heat-responsive and novel microRNAs in Populus tomentosa. Gene 504:160–165.

- Cheng MC, Ko K, Chang WL, Kuo WC, Chen GH, Lin TP. 2015. Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis. *The Plant Journal* 83:926–939. doi: 10.1111/tpj.12940
- Chi X, Yang Q, Chen X, Wang J, Pan L, Chen M, Yang Z, He Y, Liang X, Yu S. 2011. Identification and characterization of microRNAs from peanut (*Arachis hypogaea* L.) by high-throughput sequencing. *PLoS One* e27530.
- Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research* 46:486–494.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139:5–17. doi:10.1104/pp.105.063743
- De Costa W, Zorb C, Hautung W, Schubert S. 2007. Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum* 131:311–321
- Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y. 2009. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany* 103:29–38.
- Echavarría-Cháirez FG, Serna-Pérez A, Rubio-Aguirre FA, Rumayor-Rodríguez A.F, Salinas-González H. 2009. An assessment of Fourwing saltbush (*Atriplex canescens*) productivity for crop conversion potential in two study cases. *Técnica Pecuaria en México* 47:93–106.
- Eldem V, Akçay U, Ozhuner E, Bakır Y, Uranbey S, Unver T. 2012. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. *PLoS One* 7:e50298.
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL. 2007. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of miRNA genes, *PLoS One* 2:e219.

- Faycal B, Mounir D. 2011. Physiological and biochemical changes of two halophytes, *Nitraria retusa* (Forssk.) and *Atriplex halimus* (L.) under increasing salinity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 6:327–339.
- Flatman PW. 1991. Mechanism of magnesium transport. *Annual Review of Physiology* 52:259–271.
- Gigolashvili T, Berger B, Mock HP, Müller C, Weisshaar B, Flügge UI. 2007. The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 50:886–901
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:463–499. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.463
- Ho CL, Noji M, Saito K. 1999a. Plastidic pathway of serine biosynthesis. Molecular cloning and expression of 3-phosphoserine phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 274:11007–11012. doi: 10.1074/jbc.274.16.11007
- Ho CL, Noji M, Saito M, Saito K. 1999b. Regulation of serine biosynthesis in *Arabidopsis*. Crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in non-photosynthetic tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 274:397–402. doi: 10.1074/jbc.274.1.397
- Ho CL, Noji M, Saito M, Yamazaki M, Saito K. 1998. Molecular characterization of plastidic phosphoserine aminotransferase in serine biosynthesis from *Arabidopsis*. *Plant Journal* 16:443–452. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00313.x
- Ho CL, Saito K. 2001. Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 20:243–259. doi: 10.1007/s007260170042
- Hossain MS, Persicke M, ElSayed AI, Kalinowski J, Dietz KJ. 2017. Metabolite profiling at the cellular and subcellular level reveals metabolites associated with salinity tolerance in sugar beet. *Journal of Experimental Botany* 68:5961–5976. doi: 10.1093/jxb/erx388

- Iwata K, Tazawa M, Itoh T. 2001. Turgor pressure regulation and the orientation of cortical microtubules in Spirogyra cells. *Plant Cell Physiology* 42:594–598.
- Jasoni RL, Cothren JT, Morgan PW, Sohan DE. 2002. Circadian ethylene production in cotton. *Journal of Plant Growth Regulation* 36:127–133
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N. 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology* 136:4159–4168. doi: 10.1104/pp.104.052142
- Kito K, Tsutsumi K, Rai V, Theerawitaya C, Cha-Um S, Yamada-Kato N. 2017. Isolation and functional characterization of 3-phosphoglycerate dehydrogenase involved in salt responses in sugar beet. *Protoplasma* 254:2305–2313. doi: 10.1007/s00709-017-1127-7
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D. 2005. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21: 1635–1638
- Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12:206–212.
- Li B, Qin Y, Duan H, Yin W, Xia X. 2011. Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*, *Journal of Experimental Botany* 62:3765–3779.
- Li M, Guo R, Jiao Y, Jin X, Zhang H, Shi L. 2017. Comparison of Salt Tolerance in Soja Based on Metabolomics of Seedling Roots. *Frontiers in Plant Science* 8: 1101. doi: 10.3389/fpls.2017.01101
- Li M, Xia Y, Gu Y, Zhang K, Lang Q, Chen L, Guan J, Luo Z, Chen H. 2010. MicroRNAome of Porcine Pre and Postnatal Development. *PLoS One* 5:e11541.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1:387–396

- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC. 2008. Microarray-based analysis of stress regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14:836–843.
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J. 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24:732–737.
- Mao W, Li Z, Xia X, Li Y, Yu J. 2012. A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber. *PLoS One* 7:e33040.
- Martínez G, Forment J, Llave C, Pallás V, Gómez G. 2011. High-throughput sequencing, characterization and detection of new and conserved cucumber miRNAs. *PLoS One* 6:e19523.
- Meyer C, Grey F, Kreklywich CN, Andoh TF, Tirabassi RS, Orloff SL, Streblow DN. 2010. Cytomegalovirus MicroRNA Expression Is Tissue Specific and Is Associated with Persistence. *Journal of Virology* 85:378–389.
- Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X, Green PJ. 2008. Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell* 20:3186–3190.
- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C. 2008. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133:116–127.
- Mishra P, Mishra V, Takabe T, Rai V, Singh NK. 2016. Elucidation of salt-tolerance metabolic pathways in contrasting rice genotypes and their segregating progenies. *Plant Cell Reponse* 35:1273-1286.
- Mitsch WJ, Gosselink JG. 1993. *Wetlands*. 2<sup>a</sup> ed. Van Nostrand Reinhold: Nueva York, pp. 633–638.
- Moreno-Limón S, González-Luna R, Garza-Aguirre R, Foroughbakhch-Pournavab R. 2014. Leaf, stem and root content of proline in *Atriplex canescens* and *Suaeda nigra*. *International Journal of Bioresources and stress management* 5(1):082–085.



- Morin RD, Aksay G, Dolgosheina E, Ebhardt HA, Magrini V, Mardis ER, Sahinalp SC, Unrau PJ. 2008. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa*. *Genome Research* 18:571–584.
- Mozafar A, Goodin JR. 1970. Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus*. *Plant Physiology* 45:62–65.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Reviews of Plant Biology* 59:651–681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment* 25:239–250.
- Obata T, Fernie AR. 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Molecular Life Science* 69:3225–3243
- Obata T, Witt S, Lisec J, Palacios-Rojas N, Florez-Sarasa I, Yousfi. 2015. Metabolite Profiles of Maize Leaves in Drought, Heat, and Combined Stress Field Trials Reveal the Relationship between Metabolism and Grain Yield. *Plant Physiology* 169:2665–2683. doi: 10.1104/pp.15.01164
- Planells E, Aranda P, Perán F, Llopis J. 1993. Changes in calcium and phosphorus absorption and retention during long term magnesium deficiency in rats. *Nutrition Research* 113:691–699.
- Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 20:3407–3425.
- Ren Y, Chen L, Zhang Y, Kang X, Zhang Z, Wang Y. 2013. Identification and characterization of salt-responsive microRNAs in *Populus tomentosa* by high-throughput sequencing, *Biochimie* 95:743–750.
- Ros R, Munoz-Bertomeu J, Krueger S. 2014. Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in Plant Science* 19:564–569. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.003
- Sage RF, Li M, Monson RK. 1999. The taxonomic distribution of C4 photosynthesis. In: Sage R.F. and Monson R.K. Eds. *C4 Plant Biology*. Academic press: New York, pp. 551-584.

- Scholl RL, May ST, Ware DH. 2000. Seed and molecular resources for Arabidopsis. *Plant Physiology* 124:1477–1480. doi: 10.1104/pp.124.4.1477
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder AL. 2015. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 656.
- Shi H, Zhu JK. 2002. Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 50:543–550.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18:2051–2065.
- Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G. 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science* 17:196–203
- Sunkar R, Zhu JK. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2001–2019.
- Szittyá G, Moxon S, Santos DM, Jing R, Fevereiro MP, Moulton V, Dalmay T. 2008. High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics* 9:593.
- Toujani W, Muñoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Rosa-Téllez S, Anoman AD, Alseekh S. 2013. Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in Arabidopsis. *Plant Physiology* 163:1164–1178. doi: 10.1104/pp.113.226720
- Verslues PE, Sharma S. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book* 8:e0140
- Voznesenskaya EV. 1999. Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae). *Journal of Experimental Botany* 50:1779–1795.
- Waditee R, Bhuiyan NH, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M. 2007. Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. *The Journal of*

Biological chemistry 282:34185–34193. doi: M704939200  
[pii]10.1074/jbc.M704939200.

- Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Tanaka Y, Fukaya M, Takabe T. 2017. Overexpression of halophilic serine hydroxymethyltransferase in fresh water cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 results in increased enzyme activities of serine biosynthetic pathways and enhanced salinity tolerance. *Archives of Microbiology* 199:29–35. doi: 10.1007/s00203-016-1271-z
- Wang F, Li L, Liu L, Li H, Zhang Y, Yao Y, Ni Z, Gao J. 2012. High-throughput sequencing discovery of conserved and novel microRNAs in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Molecular Genetics and Genomics* 287:555–563.
- Wani SH, Sah SK, Hussain MA, Kumar V, Balachandra SM. 2016. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in crop plants, *Advances in Plant Breeding Strategies*, Vol. 2 Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits, Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., and Johnson, D.V., Eds., Gewerbestrasse: Springer International, pp. 345–396.
- Wei Z, Liu X, Feng T, Chang Y. 2011. Novel and Conserved Micrnas in Dalian Purple Urchin (*Strongylocentrotus nudus*) Identified by Next Generation Sequencing. *Internacional Journal of Biological Science* 7:180–192.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. *Annual Review of Plant Biology* 57:781–803.
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307:932–935.
- Yu X, Wang H, Lu Y, De Ruiter M, Cariaso M, Prins M. 2011. Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany* 63:1025–1038.
- Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA. 2006. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cell Molecular of Life Science* 63:246–254.

- Zhang XN, Li X, Liu JH. 2014. Identification of conserved and novel cold Responsive microRNAs in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) using high-throughput sequencing. *Plant Molecular Biology Reporter* 32:328–341.
- Zhu JK, Liu J, Xiong L. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10:1181–1191. doi: 10.1105/tpc.10.7.1181
- Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6:66–71.
- Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Reviews of Plant Biology* 53:247–273.
- Zhu JK. 2006. Over expression of a delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Trends in Plant Science* 9:66–72.
- Zhu JK. 2010. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6:441–445.
- Zhu JK. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167:313–324. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.029.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31:3406–3415.

## 9. RESUMEN BIOGRÁFICO

**Raúl Alejandro Garza Aguirre**

Candidato para el grado de:

**Doctor en Ciencias con acentuación en Manejo y administración de recursos  
vegetales**

**Tesis:** RESPUESTA MORFOFISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE  
*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. A ESTRÉS SALINO  
Y TRANSFERENCIA DE HALOTOLERANCIA  
HACIA UN ORGANISMO MODELO

**Campo de estudio:** Ecofisiología vegetal

**Datos personales:** Nacido en Monterrey Nuevo León el 06 de abril de 1985

**Educación:** Lic. Químico Bacteriólogo Parasitólogo, egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**Experiencia profesional:**

2014 -Productos Biotecnológicos S.A. de C.V.

*Ventas y soporte técnico*

2015-Servicios científicos, tecnológicos y comerciales Tetrarium S.A. de C.V.

*Consejo administrativo/socio accionista*

2017- Profesionales de la industria y laboratorio S.A de C.V.

*Administrador único/ representante legal*

2018-NativeGen de México S.A.P.I de C.V.

*Consejo administrativo/socio accionista*

2019-MÁSSalud

*Administrador único/Responsable sanitario*